

CLINICA CHIMICA ACTA

INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY

EDITORIAL BOARD

J. AWAPARA (Houston); P. BOULANGER (Lille); K. HINSBERG (Düsseldorf); B. JOSEPHSON (Stockholm); N. F. MACLAGAN (London); L. MASSART (Ghent); V. N. OREKHOVITCH (Moscow); F. RAPPAPORT (Tel Aviv); M. SAITO (Tokyo); M. C. SANZ (Geneva); HJ. STAUDINGER (Mannheim); C. P. STEWART (Edinburgh); D. D. VAN SLYKE (Upton, Long Island, N. Y.); J. C. M. VERSCHURE (Utrecht)

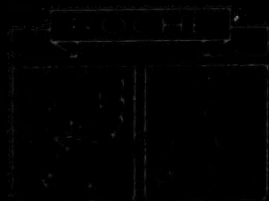
ADVISORY BOARD

H. D. APPLETON (New York); J. G. G. BORST (Amsterdam); C. JIMÉNEZ DÍAZ (Madrid); C. DE DUVE (Louvain); F. FEIGL (Rio de Janeiro); L. H. HEMPELMANN (Rochester, N.Y.); E. JORPES (Stockholm); T. LEIPERT (Vienna); R. A. MCCANCE (Cambridge); A. J. P. MARTIN (London); T. REICHSTEIN (Basel); A. TISELIUS (Uppsala)



ELSEVIER PUBLISHING COMPANY
AMSTERDAM

Clin. Chim. Acta, Vol. 4, No. 1, p. 1-148, January 1959



Roche Biochemicals

New developments in biochemical research call for new biochemicals; listed below is a selection of compounds of outstanding current interest from more than 300 Roche biochemicals.

Biogenic amines,
their precursors
and metabolites

Metabolism of serotonin

Serotonin

DL-5-Hydroxytryptophan

5-Hydroxy-3-indolacetic acid

Tryptamine Gramine

Metabolism of epinephrine

L-, D- and DL-Dihydroxyphenylalanine (Dopa)

3-Hydroxytyramine (Dopamine)

Tyramine Hordenine

Digitonin 'Roche'

For reliable serum cholesterol
determinations

cf. Sperry, W. M. & Webb, M.:
J. biol. Chem. **187**, 97 (1950)

Xanthurenic acid

For the assessment of vitamin B₆
deficiency

Pyridoxal-5'-phosphate (cryst.)

Co-enzyme of various transaminases, decarboxylases
and other enzymes

The catalogue of biochemicals,
complete with price-list, may be
ordered from
Biochemicals Department
F. Hoffmann-La Roche & Co. Ltd.
Basle/Switzerland

ERRATA

Clin. Chim. Acta, Vol. 3 (1958) page 317. The third line from the top should read as follows:

Reagents: (1) Complexon III 0.0030 M: 1.1163 g di-sodium versenate 2 aq. is dissolved up to 1,000 ml in twice-distilled water.

Clin. Chim. Acta, Vol. 3 (1958) page 444.

In the last line of the section METHOD, for " ± 0.05 moles" read " ± 0.05 mmoles".

Clin. Chim. Acta, Vol. 3 (1958) page 480.

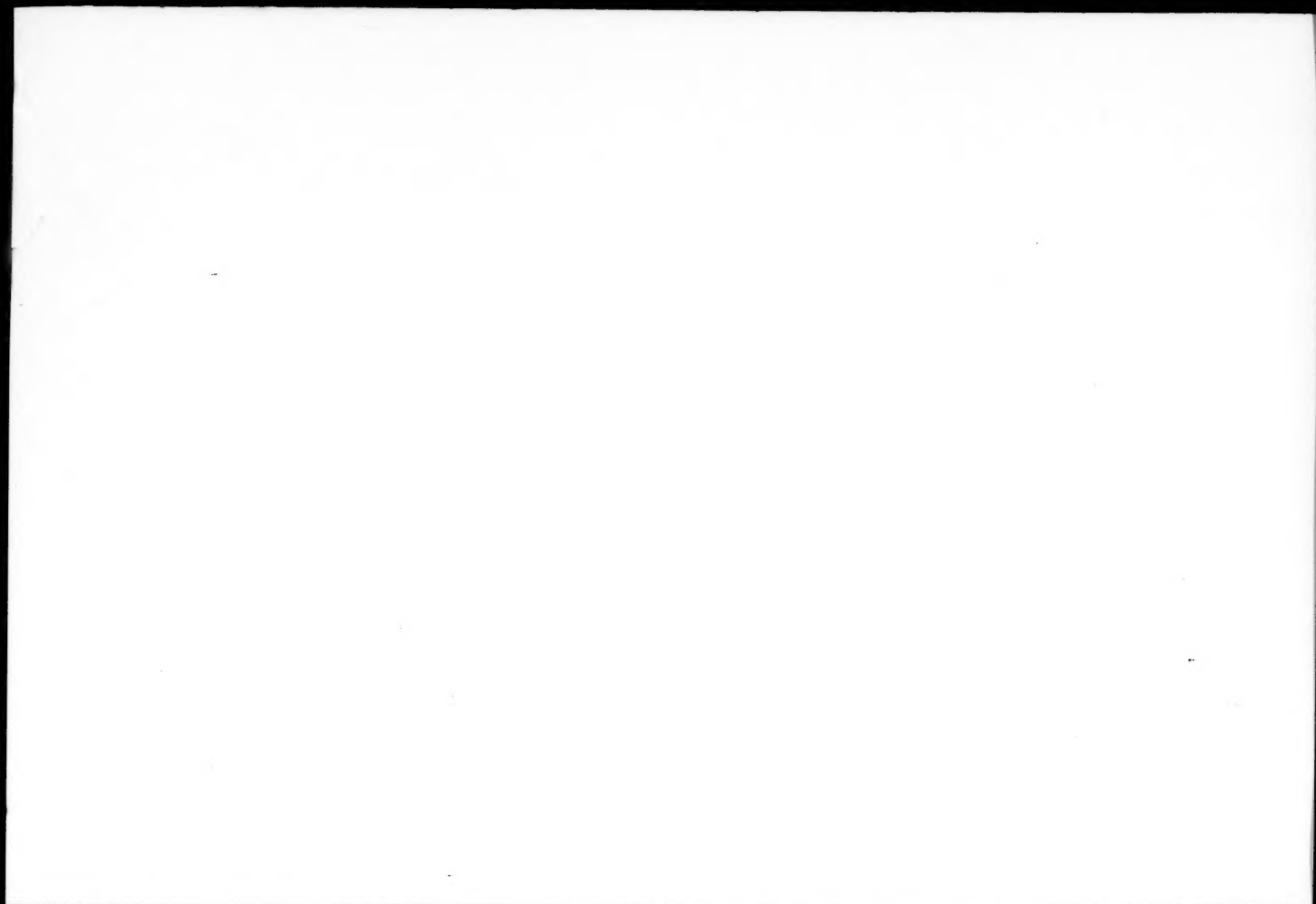
Le titre de l'article par F. GEUBELLE ET M. NICOLAS-GOLDSTEIN est à modifier comme suit:

Comparaison entre le CO₂ et le pH du sang capillaire et du sang artériel.

Clin. Chim. Acta, Vol. 3 (1958) Seite 562.

In der Unterschrift von Fig. 3 ist die Formel zu ersetzen durch:

$$\text{Cl-R. in \% F.G.} = \frac{\text{mval Cl/kg F.G.} \cdot 100}{1.05 \cdot \text{mval Cl/l Serum}}$$



edited by
H. PEETERS

Protides

*of the
Biological
Fluids*

6th Colloquium 1958

ELSEVIER



PROTIDES

of the Biological Fluids 1958

PROCEEDINGS OF THE SIXTH COLLOQUIUM, BRUGES 1958

Edited by

H. PEETERS

Director of the Laboratory of St. Jan's Hospital, Bruges (Belgium)

The aim of the Sixth Colloquium was to present a detailed picture of the whole field of the protides of the biological fluids.

The first section of this volume contains the papers presented at the twelve plenary sessions, where subjects of general interest were treated, such as modern experimental methods, interpretation of experimental results, and more recent findings of general importance.

The other sections contain reports of a more specialized character: techniques, cerebrospinal fluid and general subjects, isolated protein fractions, macroglobulins, protides and reproduction, protides in disease, protides and digestion, miscellaneous subjects.

The Proceedings also include two Round-Table Discussions:

"Protein Pattern in Normal and Pathological Cases", "Electrophoretic Techniques", and a final lecture, given at the Brussels World Exhibition by C. Wunderly of Zurich, entitled: Proteins: Friend and Foe of Better Mankind. Of the 53 papers 23 have been published in *Clinica Chimica Acta*.

Papers by:

Ch. Wunderly (Zürich), E. Wiedemann (Basel), H. E. Schultze (Marburg/Lahn), G. Schwick (Marburg/Lahn), K. Hannig (München), H. Peeters (Bruges), P. Vuylsteke (Bruges), H. C. Heinrich (Hamburg), J. C. M. Verschure (Utrecht), R. J. Wieme (Gand), F. Gabl (Innsbruck), E. van Oye (Léopoldville), P. Burtin (Paris), C. B. Laurell (Malmö), F. W. Aly (Marburg/Lahn), M. Nyman (Malmö), J. F. Heremans (Louvain), J. Bodman (London), R. Martin du Pan (Genève), G. Hermann (Homburg/Saar), T. Aronsson (Uppsala), F. Lohss (Tübingen), F. Hartmann (Marburg/Lahn), M. Kessel (Berlin), T. H. J. Huisman (Groningen), M. de Blasiis (Novara), J. Kohn (London), R. Fauve (Versailles), E. Balle-Helaers (Bruxelles), Joh. Booij (Amsterdam), M. van Sande (Anvers), A. J. Boom (Flushing), F. J. Rein (Tautenbronn), N. Lang (Marburg/Lahn), H. Baars (Utrecht), J. J. W. Imhof (Utrecht), R. Weismann-Netter (Paris), J. J. Scheidegger (Genève), B. Drevon (Lyon), F. A. Pezold (Berlin-West), C. Franzini (Novara), R. Niaussat-Ansault (Jonzac), R. Delcourt (Bruxelles), Ch. Guyotjeannin (Billancourt), F. Penaranda (Angers), F. Wewalka (Wien), E. M. Demaeyer (Lwiro, Congo Belge), J. M. Denucé (Gent).

6 1/2 x 9 1/2" 326 pages 170 illustrations 56 tables 1959
45 s. or \$ 8.50 or Dfl. 24.00

still available **Protides of the Biological Fluids 1957**

Proceedings of the Fifth Colloquium, Bruges 1957

Edited by

H. PEETERS

Director of the Laboratory of St. Jan's Hospital, Bruges (Belgium)

6¹/₂ x 9¹/₂" 264 pages 121 illus. 31 tables 1958 45 s. \$ 8.50 Dfl. 24.00

ORDER FORM

To

Date:

Please send

..... copy(ies) of PROTIDES OF THE BIOLOGICAL FLUIDS 1958

..... copy(ies) of PROTIDES OF THE BIOLOGICAL FLUIDS 1957

Name (please print)

Address:

City, State

Send to your bookseller or to Elsevier Publishing Company, 112 Spuistraat, Amsterdam

(For U.S.A. and Canada: D. VAN NOSTRAND COMPANY INC., 120 Alexander Street, Princeton N.J.)

ORDER FORM

To

Date:

Please send

..... copy(ies) of PROTIDES OF THE BIOLOGICAL FLUIDS 1958

..... copy(ies) of PROTIDES OF THE BIOLOGICAL FLUIDS 1957

Name (please print)

Address:

City, State

Send to your bookseller or to Elsevier Publishing Company, 112 Spuistraat, Amsterdam

(For U.S.A. and Canada: D. VAN NOSTRAND COMPANY INC., 120 Alexander Street, Princeton N.J.)

Protides of the Biological Fluids

POSTCARD



To

.....

.....

POSTCARD



To

.....

.....



ELSEVIER

CLINICA CHIMICA ACTA

Vol. 4 (1959)



CLINICA CHIMICA ACTA

INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY

EDITORIAL BOARD

J. AWAPARA (Houston); P. BOULANGER (Lille); K. HINSBERG (Düsseldorf); B. JOSEPHSON (Stockholm); N. F. MACLAGAN (London); L. MASSART (Ghent); V. N. OREKHOVITCH (Moscow); F. RAPPAPORT (Tel Aviv); M. SAITO (Tokyo);
M. C. SANZ (Geneva); HJ. STAUDINGER (Mannheim);
C. P. STEWART (Edinburgh); D. D. VAN SLYKE (Upton, Long Island, N.Y.); J. C. M. VERSCHURE (Utrecht)

ADVISORY BOARD

H. D. APPLETON (New York); J. G. G. BORST (Amsterdam);
C. JIMÉNEZ DÍAZ (Madrid); C. DE DUVE (Louvain); F. FEIGL (Rio de Janeiro); L. H. HEMPELMANN (Rochester, N.Y.);
E. JORPES (Stockholm); T. LEIPERT (Vienna); R. A. McCANCE (Cambridge); A. J. P. MARTIN (London); T. REICHSTEIN (Basel); A. TISELIUS (Uppsala)

Vol. 4

1959



ELSEVIER PUBLISHING COMPANY
AMSTERDAM

*Pages 1-148 contain papers presented at the 6th Colloquium
on Protides of the Biological Fluids, Bruges, May 1958*

Printed in the Netherlands by
N.V. DRUKKERIJ G. J. THIEME, NIJMEGEN

PROTEINS, FRIEND AND FOE OF BETTER MANKIND*

CH. WUNDERLY

Medical University Clinic, Zurich (Switzerland)

The title already reflects the unique position that protein occupies in the process of living. Unique, because it is not only an essential component of cells and tissues, but a component also of the most deadly toxins. The very word protein did not exist until Liebig's time. In 1839 MULDER formed the word from *primarius*, meaning: of the first importance. He wrote: Through its means, the chief phenomena of life are produced. In view of such a recognition much work was done by chemists, but even EMIL FISCHER's attempts to synthesize protein remained unsuccessful. Biochemistry became static. The idea prevailed that once a molecule had entered into the "protoplasm", it ceased to obey the laws of chemistry. When calcium got into living tissue it ceased to be calcium! The colloidal state of the protein as macromolecule created an insurmountable barrier to further investigation. The next impulse came from HARDY and from SOERENSEN, who laid the foundations for the physical chemistry of proteins. Thereupon TISELIUS AND SVEDBERG provided the necessary analytical techniques with electrophoresis and with the ultracentrifuge, respectively.

Indirect methods of research, like macromolecular chemistry, double refraction, dichroism, X-ray diffraction, made it possible to provide evidence for the arrangement of submicroscopic protein structures, of gels, fibres and fibrils. At that stage, submicroscopic morphology was an exciting field of trial and error for morphologists interested in biophysics. The advent of the electron microscope, after 1938, made photography of such structures feasible and the romance of discovery gave place to the technical problem of obtaining objects thin enough to give the best possible image in the electron microscope. Today protein chemists are at work in modern histological laboratories. Morphologists and chemists are partners in the game, and their team-work has led to important results regarding the chemical morphology of the cells, of the basic substance, of collagen and elastic tissue, of loose mesenchymal structures, as well as of cartilage and bone.

By X-ray analysis, structural chemistry has provided exact data on the mutual distance of the atoms and groups of crystallizing proteins. In 1948 PORTER AND SANGER determined the N-terminal residues of haemoglobins in a number of animal species.

After the fine results concerning the structure of insulin, more complex proteins are gradually yielding insight into their structures. Already, the structure of several of the links composing the peptide chains is known. Recent development of methods for investigating the arrangement of amino acid residues in proteins showed that a pure protein is really a single chemical substance. Only a better knowledge of the exact structure of proteins will reveal the unique part played by proteins at the molecular level in the living organism.

The sensitivity of the latest methods allows the detection of the replacement of

* Read at the final session of the 6th Colloquium, at the World Exhibition, Brussels.

two of the 600 amino acids in the haemoglobin molecule. It has been shown that some of the heterogeneities in the haemoglobin molecule derive from physical changes after the synthesis of the protein, whilst others are genetically controlled. Thus even at this very advanced stage of investigation, the formulation given by MICHAELIS: "We know what it can be, what it might be and still it is different!" still holds good.

If we take the average weight of man to be 70 kg, only 2.5% of it is protein. Of these 1750 g, 15 g are newly formed daily, about 50% of them in the liver. The human organism synthesizes daily 8 g of haemoglobin, 17 g of plasma albumin, 5 g of plasma globulin and 32 g of the proteins of muscle, tissues and skin. These body proteins form the matrix of the living system; they are the catalysts, the centers around which the dynamic equilibria of life develop. The primary purpose, therefore, of dietary proteins is to fill the stores of the body. Their biological evaluation opened a new phase of research on the nutritive value of proteins.

The purposes of protein nutrition are fulfilled, however, only if all the raw materials are present in optimal amounts. If carbohydrate and fat are missing, dietary amino acids are utilized to supply energy so that the construction and repair of the living machine are reduced or completely interrupted. Certain vitamins are active spots in the protein catalysts of intermediary metabolism.

There are indications that disturbed protein metabolism results in disturbed enzyme activity. This is not surprising since all enzymes are either proteins or are coupled with proteins. A single liver cell contains between 1000 to 10,000 different enzymes; they constitute about two thirds of the total protein of a liver cell. Therefore protein deficiency can lead to a disturbed function of various organ systems. At present biochemical research is in the midst of a coordinative phase, endeavouring to enlighten the concerted action of fragments isolated from inside cells, variously called particles, homogenates, microsomes as well as mitochondria. Radioactive tracer studies have revealed a dynamism that had heretofore been utterly unpredictable.

With great enthusiasm, biology made itself master of the new methods; so much so, that EDSALL, in 1953, stated: Protein chemistry: which was a relatively unfashionable subject a quarter of a century ago, has now become almost embarrassingly fashionable.

Macromolecular chemistry has already advanced from the molecular region into the submicroscopic region, as a new branch of structural chemistry. The demonstration of widespread morphologic changes in the fibrous connective tissues has led to the assumption that diseases like rheumatoid arthritis, rheumatic fever, lupus erythematosus, periarteritis nodosa and dermatomyositis are related. The group is called "*connective tissue diseases*" and is characterized by protean involvement of tissues of mesenchymal origin.

The investigations of protein chemists and physiologists during the past several decades, followed by those of clinicians interested in nutrition and metabolism have extended our knowledge. It has become evident that changes in *protein metabolism* were intimately connected with all disease states. In protein deficiency, wounds heal with difficulty, resistance to infection is lowered and the liver becomes vulnerable to numerous toxic agents; secondary complications set in, recovery is delayed or prevented.

A new chapter in immunology was opened up with hypersensitivity. As is well known, the clinical manifestations of *allergic reactions* result from the combination of

an antigen with an antibody which has been formed by the host, generally in response to prior contact with the antigen. In sensitivity caused by low-molecular-weight substances, such as common drugs, it is generally believed that these substances are in some way coupled with serum proteins and in this way induce the formation of antibody.

Yet another clinical aspect leads us to the role of protein in *nutrition*. One of the most important causes of morbidity and mortality in large areas of the world is the absence of suitable food, sufficiently rich in protein. Protein-rich foodstuffs are available in adequate amounts almost everywhere, but the means by which they can be processed or combined with other foodstuffs to serve as an adequate diet require further investigation. In Uganda and Guatemala, combinations of inexpensive local foodstuffs have been worked out which are apparently suited to maintaining satisfactory growth, and therefore offer hope for the development of preventive programmes. In the course of the work in Uganda it was found that vegetable oils, unlike animal fats, are well tolerated by protein-deficient children. This is an important finding, since it allows a calorie-rich diet for the treatment of young children, in place of a diet with low caloric content which has been given hitherto. This has been a great disadvantage, since children suffering from kwashiorkor have often been starved as well as deprived of protein. Kwashiorkor is the most serious and most widespread nutritional disease known today.

Most of the common nutritional energy sources are, however, too low in protein for productive purposes and must be supplemented to secure appropriate ratios of metabolizable energy to digestible protein. As many nations are dependent on the labour capacity of manufacturers abroad, the protein aspect of nutrition is an important one. If economic reasons or war interfered with free import, such nations would have to live on their own acres and then would have to change their eating habits. Only worldwide organisations like the World Health Organisation are in a position to cope with such problems. Together with the United Nations Children's Fund and the United Nations Technical Assistance Administration, they are doing excellent work. Food taboos often cause difficulties because no aspect of a culture is more deeply rooted in custom and ritual than eating habits. The kind of subtlety sometimes necessary to overcome a food taboo is shown by an incident of international work in Viet Nam. It was essential to increase the protein content of the people's diet. More cow's milk was the obvious way to make good the deficiency, but the people of Viet Nam regarded cow's milk as unfit for man. Condensed milk, however, turned out to be acceptable, especially as one of the brands used had a wrapper displaying a nestful of little birds. This picture helped to soothe the conscience of the people; they called the condensed milk "bird's milk" and so escaped losing face. If we come to think that the population of the globe is increasing daily by some 70,000 and thus has reached a total of 2.7 thousand million compared with a bare 250 millions when Christ was born, the pressing nature of the role of proteins in nutrition becomes evident.

Having thus far spoken of the beneficial aspects of protein problems, we now turn to those of its actions, where it is actively engaged in the destruction of the living organisms. We begin with *viruses*, because they are a particular source of anxiety. Many varieties of viruses isolated so far are nucleo-proteins. If the nucleic acid is separated off, the virus protein loses its pathogenic properties as well as its power to propagate. It seems that the biological action depends on the exact arrange-

ment of the nucleotide residues. Virus does not possess a self-governed metabolism, but it is probable that one single virus particle is sufficient to infect the host cell and to turn the normal metabolism of the cell into virus production. Here the mysterious auto-reproduction of virus-protein sets in, which encourages comparison with the chromonemata in the chromosomes. Viruses are always in process of rapid change and adaptation. Type and virulence are unpredictable a matter that greatly complicates the preparation of effective vaccins. As BURNET pointed out, there is good reason to think that even within historical times, there have been changes in certain human diseases which are due to the adaptation either of the host to the parasite, or of the parasite to the host, or perhaps both. In the majority of cases, best adaptation has been reached when the parasite caused the host comparatively little damage without killing it, but was able to perpetuate itself by passing from one host to another, either directly or indirectly. The organisation of the molecules in a particle of influenza virus is different from the organisation of the molecules in one of the cells of *Homo Sapiens*. BURNET believes that diseases like herpes simplex, which cause the host very little trouble, and in which the virus seems to persist from year to year for long periods of time, represent about the optimum adaptation of the parasite to the host. He considers poliomyelitis, a disease which seems to have been diminishing in severity in recent times, to be an example of a disease in the process of evolution, although in the last thirty years epidemics in the highly developed countries have reached record intensities. The 1952 epidemic in the U.S.A. for example, claimed 50,000 victims, a considerable number of whom were over fifteen. Increased severity keeping step with improved sanitation, one is tempted to consider epidemic poliomyelitis a product of high living standard. Prosperity brings its own diseases, much as managers have their own illness!

The most dangerous substances by unit of weight are bacterial *toxins*. Within this class we find a sharp contrast between the toxicity of the complex polymolecular toxins and the simple protein toxins. For instance the O-antigens of the enteric group of Gram-negative bacteria which are complexes of phospholipid-polysaccharide protein are to be lethal for man in a dose of 400 mg. Lethal doses for man have been calculated on the assumption that man is at least as susceptible, per unit of weight, as the most susceptible test animal. This low toxicity is in sharp contrast to simple protein toxins like tetanus toxin, botulinus toxin and dysentery toxin. These "exotoxins" are presumably lethal for man in doses of only $0.000.06 \text{ mg} = 0.06 \mu\text{g}$! Thus they are more potent by many orders of magnitude than the most potent low-molecular poison known, which is fluoroacetate; here the toxicity for man is 70,000 times smaller. The comparison of such toxicities constitutes a clear evidence for the magnitude of biological action of a devastating type brought about by protein molecules! For example, assuming that the exposition in Bruxelles will be visited by 50 million people—only 3 grams of the said toxins would be needed to bring sudden death to them. Fortunately man has learned to counteract such toxic action through inactivation by homologous antibody. Here again, as with antitoxins, precipitins and agglutinins, we have proteins capable of reacting in a specific way. In action as in reaction: proteins are involved.

In history's greatest immunization campaign, 192 million people were tested and 74 million vaccinated against tuberculosis with *Bacillus Calmette-Guerin* serum between 1948 and 1957.

The last ten years have witnessed a dramatic decline in the extent and severity of diseases like cholera, typhus, smallpox, plague, relapsing fever and yellow fever. In India and Pakistan 824,000 people died from cholera in the years from 1945 to 1949, against 385,000 from 1950 to 1954.

Epidemic typhus is now disappearing in Europe and North America and declining in the other continents. Yellow fever showed a decline of about 50 % between 1950 and 1955. Up to 1948 about 300 million people were attacked by malaria each year and 3 million died. During ten years of malaria campaigns, these figures were cut by 30%, but out of the 60 known types of anopheles which spread malaria, four have shown resistance to insecticides. This shows that the campaigns must be pursued rather vigorously before insect-resistance to spraying develops.

These few examples show that protein in the form of vaccine, blood transfusions, blood-group test sera and of sera for abnormal antibodies is an important tool in the struggle for making good health prevail throughout the world, thus releasing in all their abundance the creative powers of man, the powers he needs to tackle and surmount his problems. Although technically advanced communities are spared mass diseases, malnutrition, and parasitic plague that kill millions annually in the under-developed countries and doom still more to lifelong invalidism and lack of energy, these population of prosperous countries is subject to some untoward consequences of prosperity. Nervous tension and strain have also created new diseases. Much coordination and good will is needed, the sharing of skill and experience, helping to the weak by the strong, the rapid distribution of important information and essential knowledge. May we never forget that all of us who work on protein problems are furthering this kind of knowledge, and who can say what dreams might not come true!

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to acknowledge that much of the material compiled was derived from publications by F. M. BURNET, R. A. PETERS, E. A. KABAT, A. FREY-WYSSLING, T. H. J. HUISMAN, as well as of the World Health Organisation, Geneva.

ÜBER DIE MODERNE UNTERSUCHUNGSTECHNIK BIOLOGISCHER FLÜSSIGKEITEN UND PRÄPARATE MITTELS DER KLASSISCHEN ELEKTROPHORESE UND DER ULTRAZENTRIFUGE

E. WIEDEMANN

Pharmazeutisch-Chemische Abteilung der Sandoz A.G., Basel (Schweiz)

ELEKTROPHORESE

Die Grundlagen der klassischen Elektrophorese sind vor nunmehr 20 Jahren von TISELIUS¹ mit der von ihm angegebenen Zelle, sowie mit der von ihm angeregten optischen Messung der Vorgänge in dieser Zelle gegeben worden. Dieses Verfahren gewann nicht nur für die Plasmaproteine, sondern auch für die riesige Zahl anderer, biologisch wichtiger Proteine und deren Symplexe rasch erhebliche Bedeutung; es wurde deshalb immer weiter ausgebaut, sodass es heute in gleicher Weise zu deren Trennung und Charakterisierung, wie auch zu deren quantitativer Bestimmung geeignet ist. Dieser Ausbau betrifft eine genauere Kenntnis der Vorgänge in der Zelle unter der Wirkung des elektrischen Feldes, die Durchbildung der Zelle und ihres Zubehörs, sowie die Einführung neuer, genauester optischer Messmethoden.

Die Vorgänge in der Zelle sind, ausser von TISELIUS selbst, insbesondere von SVENSSON², LONGSWORTH UND MCINNES³ und WIEDEMANN⁴ untersucht worden⁵; das Ergebnis dieser und weiterer Arbeiten führte zu der wünschenswert genauen Beziehung des optisch und daher völlig objektiv aufgezeichneten Bildes (zumeist eines Diagramms) zu diesen Vorgängen. Die Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeiten und der Mengen mit der klassischen Elektrophorese ist daher sehr genau und die unvermeidlichen Fehler überschreiten $\pm 0.3\%$ nicht.

Die Durchbildung der Zelle und ihres Zubehörs betraf die Weglassung der mittleren Unterteilung der Zelle, womit das Auflösungsvermögen verdoppelt oder der Bedarf an Untersuchungslösung halbiert werden konnte, sowie wichtige Neuerungen an den Zellensätzen: Schliffverbindungen aller Glasteile, verschliessbare Elektrodengefässe, verfeinerte Verschiebeeinrichtungen für die Lösung und das Zellen-Mittelteil und Mehrschlitzblenden für verschiedene optische Messverfahren.

Die Standard-Zelle weist bei 3 mm Breite 80 mm, die Mikro-Zelle bei 2 mm Breite 40 mm Wanderungsweg auf; die letztere gestattet damit noch genaue Analysen von 1–3 mg Substanz. Noch kleinere Zellen sind zwecklos, da bei weiterer Verkürzung des Wanderungsweges das Auflösungsvermögen ungenügend wird. Insbesondere die Standard-Zellen sind verschiedentlich modifiziert worden, beispielsweise für die gleichzeitige Messung des Potentialverlaufs⁶, für Doppel- und Mehrfach-Versuche⁷ und für die gleichzeitige Anwendung mehrerer optischer Messverfahren⁸.

Die durchstrahlten schmalen Zellenwände müssen genau planparallel und von Interferenz-Qualität sein, um die Genauigkeit der modernen optischen Messverfahren ausnützen zu können.

Für präparative Zwecke, zum Beispiel zur Darstellung reiner Protein-Fractionen, dienen heute Zellensätze gleicher Art von 2–10 mm Breite und 60–120 und mehr mm

Wanderungsweg; sie sind für kontinuierliches Arbeiten unter optischer Kontrolle und Probeentnahme mit Hilfe von meistens 4 MACHEBOEUFschen Kapillaren eingerichtet. Diese von uns angegebenen Zellensätze⁹ stehen gegenwärtig am Ende einer Entwicklungsreihe, die von TISELIUS ausgegangen ist und in welcher SVENSSON¹⁰ und andere viel Mühe darauf verwendet haben, den praktischen Erfordernissen zu entsprechen. Das Trennvermögen dieser Zellensätze⁹ ist besser als $0.1 \cdot 10^{-5} u(v)$.

Die Alimentation aller Zellensätze erfolgt heute durch elektronisch stabilisierte Gleichrichter, ihre Thermokonstanthaltung durch vollautomatische Kühleinrichtungen.

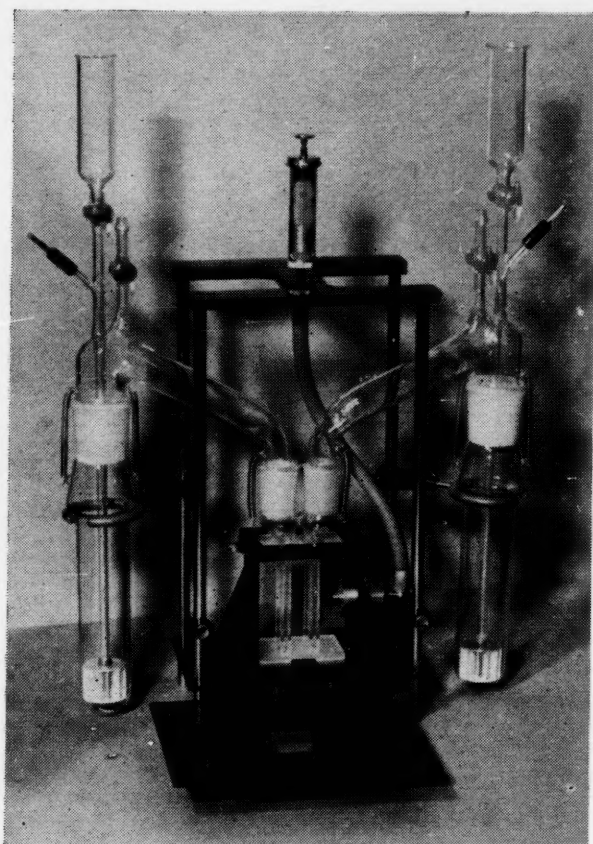


Fig. 1. Analytischer Standard-Zellensatz.

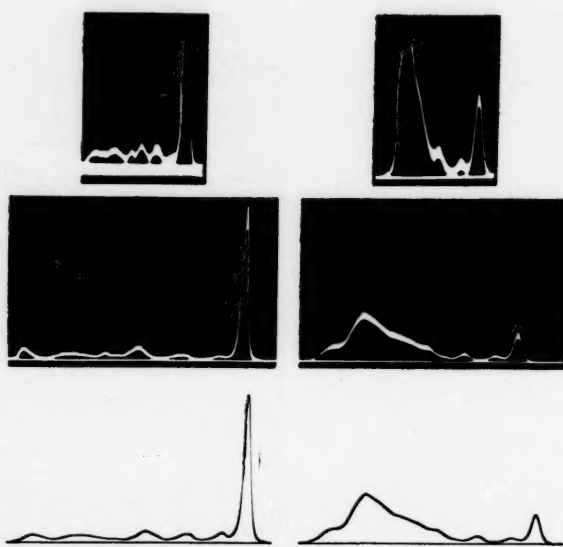


Fig. 2. Von oben nach unten: Direkte Diagramme, anfängliche Bildqualität; Direkte Diagramme, gegenwärtige Bildqualität; Phasenplatten-Diagramme, erhöhte Bildqualität.

Die Einführung neuer, genauester optischer Messmethoden, die bei der klassischen Elektrophorese vielleicht den grössten der Fortschritte bedeutet, geht ebenfalls auf TISELIUS zurück, der selbst die TOEPLERSche Schlierenmethode¹¹ zur Gradientenabbildung herangezogen hatte. SVENSSON¹² erweiterte diese durch das Diagramm-Verfahren, mit dem die einzelnen Gradienten als GAUSS-Verteilungskurven darstellbar sind, deren Fläche unter Einbezug der Basis ein Mass für die Menge der sie verursachenden Substanzen darstellt. Dasselbe gelang etwa gleichzeitig LONGSWORTH¹³.

Damit konnte ausser der elektrophoretischen Beweglichkeit $u(v)$, deren Mass die Weglänge ist, nun auch die Menge der wandernden Stoffe gemessen werden. Es zeigte sich bald, dass diese Messung die praktisch wichtigste ist. Sie begründete denn auch den weiteren Ausbau der optischen Messmethoden, die in der Form der Diagrammaufzeichnung mit dem von uns angegebenen Phasenplatten-Messverfahren¹⁴ einen gewissen Abschluss erreicht haben dürften (Fig. 2).

Bei den Phasenplatten-Diagrammen ist es erstmals gelungen, den ganzen Gradientenverlauf praktisch unabhängig vom Neigungswinkel der Kurve als gleichmäßig feine Linie und damit in erhöhter Genauigkeit aufzuzeichnen; bei den früheren Verfahren ist dies im Hinblick auf Beugungseffekte prinzipiell unmöglich.

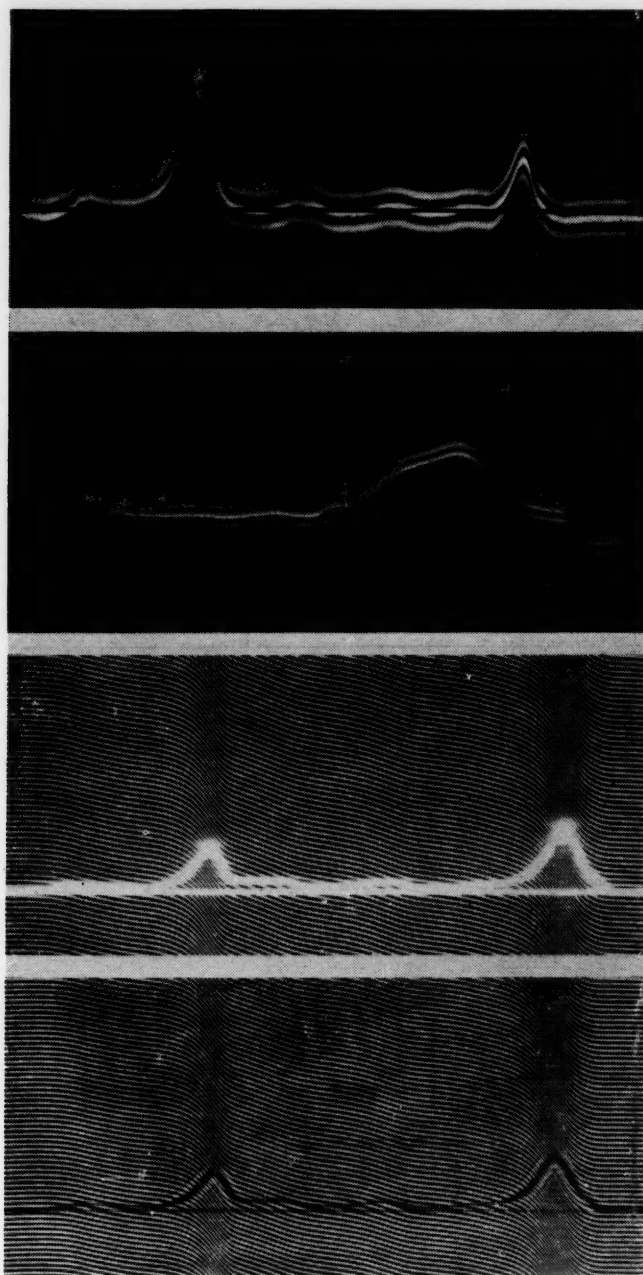


Fig. 3. Von oben nach unten: $\frac{dc}{dx}/x$ -Interferenz-Liniendiagramm (Elektrophorese); $\frac{dc}{dx}/x$ -Interferenz-Liniendiagramm (Ultrazentrifuge); $c/x - \frac{dc}{dx}/x$ -Koinzidenzbild (Elektrophorese); $c/x - \frac{dc}{dx}$ (Phasenplatten)- Simultanbild (Elektrophorese).

Zu diesen Aufnahmeverfahren sind seit einigen Jahren die sehr genauen Interferenz-Messmethoden hinzugekommen, wie sie, gestützt auf ältere Arbeiten, von SVENSSON¹⁵, LOTMAR¹⁶, ANTWEILER¹⁷ und anderen angegeben und von uns¹⁸ sowohl als $\frac{dc}{dx}/x$ -Liniendiagramm, wie auch als $c/x - \frac{dc}{dx}/x$ -Koinzidenzbild und $c/x - \frac{dc}{dx}/x$ -

Simultanbild ausgebaut und in eine praktisch brauchbare Form gebracht worden sind (Fig. 3).

Es bleibt zu wünschen, dass die Verfasser von Elektrophorese-Lehrbüchern die hier aufgezeigten Fortschritte insbesondere in Neuauflagen übernehmen und damit sowohl

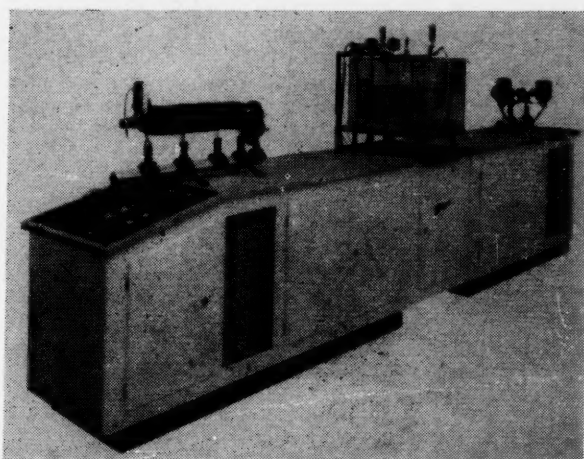


Fig. 4. Elektrophorese-Apparatur FOKAL B.

dem jeweiligen Stand der Forschung Rechnung tragen als auch die auf andere Weise nicht erreichbare Genauigkeit solcher Messungen beachten.

Als Beispiel eines Gerätes, mit dem die beschriebenen Versuche und Messungen ausführbar sind, zeigt Fig. 4 eine in Europa sehr bekannte, in zwei Grössen hergestellte Elektrophorese-Apparatur*.

ULTRAZENTRIFUGE

Die erste Ultrazentrifuge für hohe Geschwindigkeiten ist im Jahre 1926 von SVEDBERG und LYSHOLM¹⁹ gebaut worden. Diese Maschine konnte in der Folge bis zu einer Leistungsfähigkeit von 400,000 g weiterentwickelt werden. Hierüber und über den gleichzeitigen Ausbau der Theorie der Sedimentation und der Messtechnik berichtet die berühmte Monographie von SVEDBERG UND PEDERSEN²⁰ ausführlich. Als Ergebnis zahlreicher Versuche und Messungen zeigte es sich, dass es möglich ist, gelöste Stoffe mittleren bis hohen Molekulargewichts, auch wenn sie sich darin nur wenig unterscheiden, in starken Schwerfeldern zu trennen, und sie, besonders, wenn sie einheitlich sind, durch ihre Sedimentationskonstante zu charakterisieren, aus der sich schliesslich unter Einbezug der Diffusionskonstante das Molekulargewicht berechnen lässt.

Mit der Ausbreitung der Forschung auf dem Gebiet der biologisch und technisch interessanten hochmolekularen Stoffe sollte die Ultrazentrifuge bald ein grosses Anwendungsgebiet gewinnen; da aber der Typ der SVEDBERGSchen Oelturbinen-Ultrazentrifuge eine relativ grosse, teure und nicht ganz leicht zu bedienende Maschinenanlage darstellt, blieb es ihm leider versagt, die verdiente praktische Bedeutung zu erlangen. Die technischen Fortschritte der letzten Jahrzehnte führten vielmehr zu neuen Ultrazentrifugen-Typen mit elektronisch gesteuerten, Getriebe-übersetzten²¹ oder direkten²² elektrischen Antrieben, wie sie hauptsächlich von PICKELS und uns

* Hersteller: Strübin und Co., Basel (Schweiz).

ausgearbeitet worden sind. Auf diese Weise ist es nicht nur gelungen, die Ultrazentrifuge erstmals als kompaktes Gerät zu bauen, das keine Nebenräume mehr benötigt, sondern auch die Bedienung erheblich zu vereinfachen und die Konstanz von Drehzahl, Temperatur u.s.w. entsprechend zu verbessern, sodass die Durchführung von Ultrazentrifugen-Messungen Hilfskräften übertragen werden kann. Während das Getriebe der PICKELS-Ultrazentrifuge* zufolge seiner hohen Beanspruchung in regelmässigen Abständen ersetzt werden muss, ist der elektrische Direktantrieb der von uns angegebenen Ultrazentrifuge**, die in Fig. 5 wiedergegeben ist, praktisch wartungsfrei.

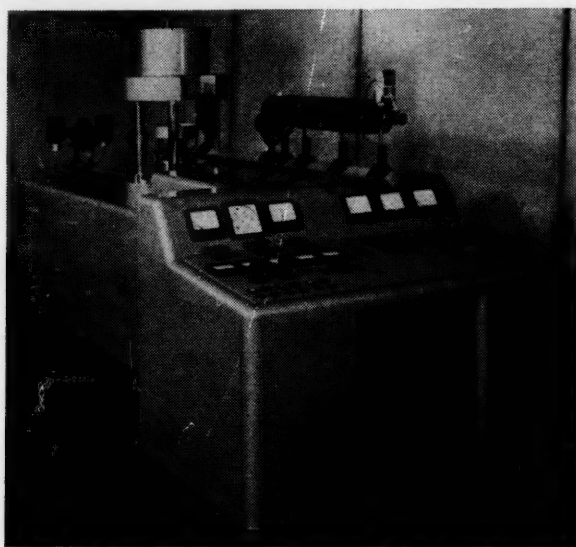


Fig. 5. Ultrazentrifuge ULTRAGYRO.

Die modernen Ultrazentrifugen profitieren selbstverständlich auch von den bereits beschriebenen Fortschritten bei den optischen Messverfahren; ausserdem gibt es für sie verbesserte, verschliessbare Messzellen für wässrige und organische Lösungsmittel, die nicht nur in Normalausführung, sondern auch als Über- und Unterschichtungszellen nach PICKELS, HARRINGTON UND SCHACHMAN²³ und MEYERHOFF²⁴, sowie als Doppelsektorzellen²⁵ zur Verfügung stehen. Die Über- und Unterschichtungszellen werden zur Bestimmung der Sedimentationskonstante niedrigmolekularer Stoffe, die Doppelsektorzellen für die gleichzeitige Aufnahme der Bezugsbasis benötigt, wenn diese zufolge der Ausbildung eines Salzgleichgewichts keine Gerade mehr ist.

Die modernen Ultrazentrifugen erreichen im Maximum 300,000 g, bleiben in ihrer Wirksamkeit also noch etwas hinter jener der SVEDBERGSchen Oelturbinen-Ultrazentrifuge zurück; immerhin sind mit elektrischen Direktantrieben für Rotoren von Standardgrösse Drehzahlen von 80,000 pro Minute heute möglich, und man hat aus vergüteten Leichtmetall-Legierungen Rotoren von Standardgrösse nach speziell berechneten Schablonen hergestellt, die Drehzahlen von 75,000 pro Minute eben noch aushalten. Es ist also damit zu rechnen, dass die modernen elektrischen Ultrazentrifugen mit ihren doch erheblichen Vorteilen bald auch die Leistungsfähigkeit der SVEDBERG-Maschinen zur Verfügung stellen werden.

* Hersteller: Beckman Instruments, Spinco Div., Fullerton, Cal., U.S.A.

** Hersteller: Escher Wyss Aktiengesellschaft, Zürich, Schweiz.

ANWENDUNG

Sowohl bei der klassischen Elektrophorese, als auch bei der Ultrazentrifugierung gilt es als Regel, die Versuche in einem definierten Milieu auszuführen, als welches bei wasserlöslichen Stoffen beispielsweise der Universalpuffer nach MICHAELIS²⁶ dienen kann (Fig. 6).

Bei der Elektrophorese wählt man die Ionenstärke μ ungefähr zu 0.1 und den pH-Wert derart, dass sowohl die Stabilität der Substanz gewährleistet ist, als auch genügend grosse Beweglichkeitswerte resultieren. Bei der Ultrazentrifuge wird an deren Stelle ein genügend grosser Dichteunterschied zwischen Lösungsmittel und hydratisierter Untersuchungssubstanz verlangt. Hier ist also bei gegebener Ionenstärke und gegebenem pH-Wert die Dichte des Lösungsmittels, beispielsweise durch D_2O -Zusatz, zu variieren. Je nachdem diese kleiner oder grösser als jene der Substanz ist, hat man Sedimentation oder Flotation zu erwarten.

Alle Versuche werden unter konstanten äusseren Bedingungen (stationäre Temperatur, stationäres elektrisches Feld, stationäres Schwerfeld) ausgeführt und mit gemessenen zeitlichen Intervallen photographisch registriert.

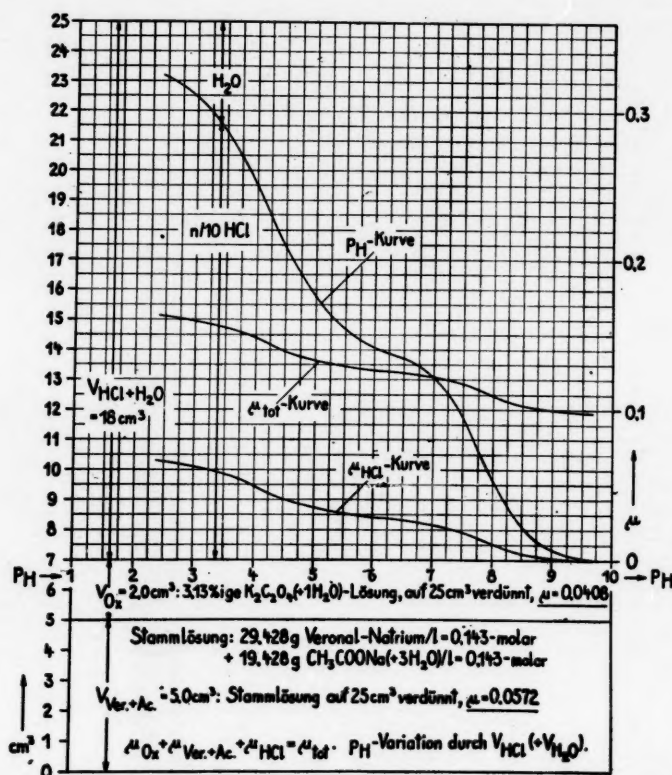


Fig. 6. Universalpuffer nach MICHAELIS, auch für Plasma-Analysen geeignete Modifikation²⁷.

Während in der Bemessung der elektrischen Felder bei der Elektrophorese kein grosser Spielraum besteht und einige Volt/cm immer richtig sind, herrscht über jene des Schwerfeldes in der Ultrazentrifuge oftmals Unklarheit. Es sei deshalb bemerkt, dass bei der Ultrazentrifuge Drehzahl und damit Schwerfeld so bemessen werden sollen, dass während des Laufs mindestens drei Bilder der wandernden Gradienten in angemessenen Zeitintervallen, beispielsweise nach je 1000 Sekunden, aufgenommen werden können. Es ist also nicht immer zweckmässig, mit Maximaldrehzahl zu fahren, obwohl es grundsätzlich richtig ist, dass im stärksten möglichen Schwerfeld unter

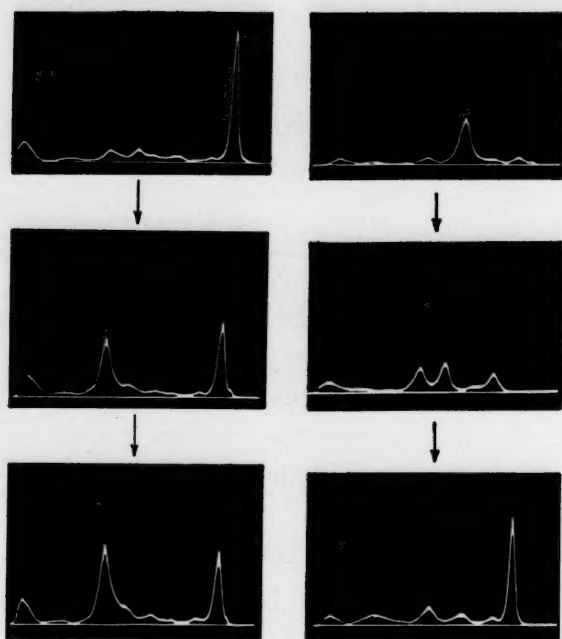


Fig. 7. Zwei Bildsequenzen (Elektrophorese). Linke Reihe: Entstehung und Verschlechterung des pathologischen Serumbildes eines Plasmocytoms ad exitum. Rechte Reihe: Besserung des pathologischen Serumbildes einer jugendlichen Lipoid-Nephrose ad restitutionem.

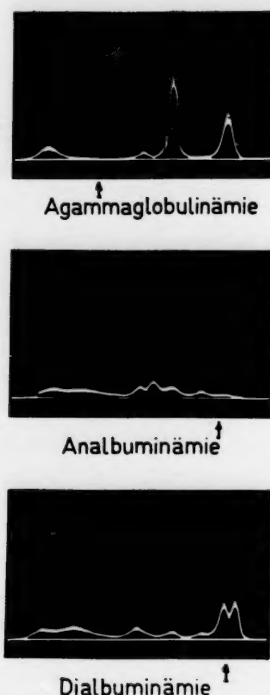


Fig. 8. Drei seltene Fälle von Anomalien der Plasmaproteine: von oben nach unten: Agammaglobulinämie, Analbuminämie, Dialbuminämie.

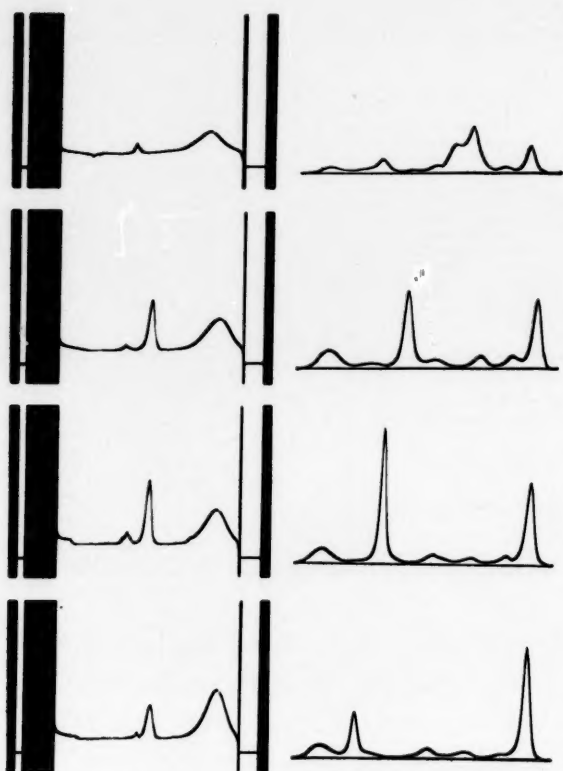


Fig. 9. Vier simultan mit der Elektrophorese und der Ultrazentrifuge untersuchte Fälle von Makroglobulinämien. Links: Ultrazentrifugen-Diagramme. Rechts: Elektrophorese-Diagramme.

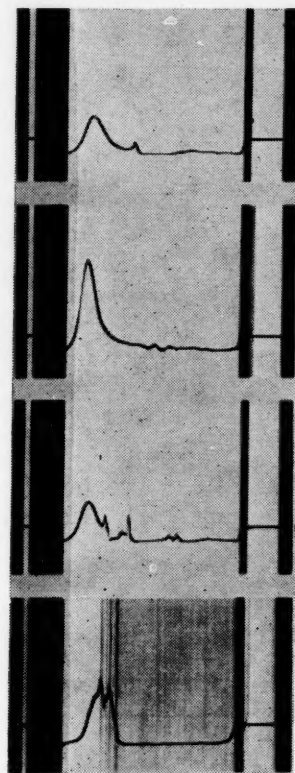


Fig. 10. Vier Beispiele von Flotationsanalysen der humanen Lipoproteine mit der Ultrazentrifuge. Von oben nach unten: aus Normalserum, aus Diabetiker-Serum, aus Atherosklerose-Serum, aus Atherosklerose-Serum.

sonst vergleichbaren Umständen die Gradientenverflachung durch die Diffusion am kleinsten und damit das Auflösungsvermögen am grössten werden. Da dieses aber nicht allein von der Drehzahl abhängt, muss das Maximum der Bilddefinition durch günstige Wahl aller Faktoren angestrebt werden.

Die beschriebenen Einrichtungen und die damit übliche Versuchstechnik werden abschliessend durch einige Beispiele belegt. Diese sind einer Sammlung unseres Laboratoriums* entnommen, die heute gegen 15,000 Aufnahmen umfasst und unter anderem zahlreiche Bildsequenzen²⁸, sowie gegen 100 mittels der Elektrophorese und der Ultrazentrifuge simultan untersuchte Fälle von Makroglobulinämien enthält²⁹. (Figs. 7-10).

Diese Aufnahmen, die mit der neuen Phasenplatten-Technik¹⁴ erhalten worden sind, und jeweils unter sich vergleichbar sind, zeigen, dass die pathologischen Makroglobuline sowohl sehr verschiedene elektrophoretische Beweglichkeiten, als auch sehr verschiedener Sedimentationskonstanten aufweisen können.

Es sei bemerkt, dass sich der Anwendungsbereich der Elektrophorese und der Ultrazentrifuge in gleicher Weise, wie es hier an Beispielen aus dem Bereich der Blutproteine gezeigt ist, auch auf andere Gebiete der Protein-Forschung und die Hochmolekularen-Forschung im allgemeinen erstreckt. Die neuerdings erzielten Fortschritte dieser Untersuchungstechnik werden dazu beitragen, unsere Kenntnisse von diesen sehr komplizierten, aber biologisch und technisch höchst wichtigen Stoffen zu erweitern und zu vertiefen.

ZUSAMMENFASSUNG

In diesem Referat wird der gegenwärtige Entwicklungsstand (1957) der klassischen Elektrophorese und der Ultrazentrifuge geschildert und sowohl mit apparativen und methodischen Angaben, als auch mit Anwendungsbeispielen belegt. Bei der klassischen Elektrophorese werden die Vorgänge in der Zelle und ihre Relation zum Bild erörtert, moderne Ausführungsformen von Zellen gezeigt, die neuen optischen Messmethoden besprochen und mit Anwendungsbeispielen belegt. Die Beschreibung eines modernen Forschungsgerätes beschliesst den ersten Teil dieses Referates. Bei der Ultrazentrifuge werden moderne Ausführungsformen dieses Instrumentes vorgestellt. Dann werden die Vorgänge bei der Sedimentation bzw. Flotation behandelt und im Anschluss daran apparative und messtechnische Einzelheiten besprochen, wie sie die Anwendung der Ultrazentrifuge auf verschiedene Arbeitsgebiete erfordert. Im dritten Teil dieses Referates wird auf die prinzipiellen Arbeitsbedingungen bei den beiden Mess- und Untersuchungsmethoden eingegangen und schliesslich an Hand zahlreicher Beispiele gezeigt, in welcher Weise verschiedene Aufgaben der Hochmolekularen-Forschung in zweckmässiger Weise angegangen und gelöst werden können.

SUMMARY

MODERN TECHNIQUES FOR INVESTIGATING BIOLOGICAL FLUIDS AND PREPARATIONS BY MEANS OF CLASSICAL ELECTROPHORESIS AND ULTRACENTRIFUGATION

This paper sketches the present state of development of classical electrophoresis and the ultracentrifuge. Apparatus and methods are described and examples are given which illustrate the way in which the techniques can be employed. In the first

* Pharmazeutisch-Chemische Abteilung der Sandoz A.G., Basel 13.

section, which deals with classical electrophoresis, the processes occurring in the cell are discussed in relation to the patterns obtained; modern types of cells are described, and new optical methods of measurement discussed. The section closes with a description of a modern research instrument. The second section deals with the ultracentrifuge. Modern centrifuges and the sedimentation and flotation processes are discussed. Details of the apparatus and measuring techniques are then reviewed with regard to the use of the ultracentrifuge in various fields. The third section of the paper is concerned with the principles underlying the practical aspects of electrophoretic and ultracentrifugal methods. The paper concludes with a discussion, illustrated by numerous examples, of the way in which the two techniques can be applied when dealing with the problems encountered in research on substances of high molecular weight.

LITERATUR

- ¹ A. TISELIUS, *Kolloid Z.*, 85 (1938) 129.
- ² H. SVENSSON, *Arkiv Kemi Mineral Geol.*, 22 A, No. 10 (1946).
- ³ L. G. LONGSWORTH AND D. A. MCINNES, *Am. Chem. Soc.*, 62 (1940) 705.
- ⁴ E. WIEDEMANN, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1946) 168.
- ⁵ Vergl. hierzu auch: H. A. ABRAMSON, L. S. MOYER AND M. H. GORIN, *Electrophoresis of Proteins*, Reinhold Publ. Corp., New York, 1942; E. WIEDEMANN, *Elektrophorese*, in: HOPPE-SEYLER-THIERFELDER, *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, 10. Aufl., Bd. I, Springer, Berlin, 1953, S. 54.
- ⁶ H. SVENSSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1974; J. VERGNOLLE, *J. chim. phys.*, 48 (1951) 296.
- ⁷ A. PERSSON UND S. H. SVENSSON, *D.B.P.*, 1.017.821.
- ⁸ H. SVENSSON, *J. Opt. Soc. Am.*, 44 (1954) 414.
- ⁹ E. WIEDEMANN, *Helv. Chim. Acta*, 31 (1948) 2037.
- ¹⁰ H. SVENSSON, *Advances in Protein Chem.*, 4 (1948) 251.
- ¹¹ A. TOEPLER, *Ann. Physik*, 127 (1866) 556; 128 (1866) 126; 131 (1867) 33; 131 (1867) 180; 134 (1868) 194.
- ¹² H. SVENSSON, *Kolloid Z.*, 87 (1939) 181; 90 (1940) 141; vergl. auch: J. ST. L. PHILPOT, *Nature*, 141 (1938) 283.
- ¹³ L. G. LONGSWORTH, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 39 (1939) 105; L. G. LONGSWORTH, TH. SHEDLOVSKY AND D. A. MCINNES, *J. Exptl. Med.*, 70 (1939) 399; L. G. LONGSWORTH AND D. A. MCINNES, *Chem. Revs.*, 24 (1939) 271.
- ¹⁴ E. WIEDEMANN, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 2074.
- ¹⁵ H. SVENSSON, *Acta Chem. Scand.*, 3 (1949) 1170; 4 (1950) 399; 4 (1950) 1329; 5 (1951) 72; 5 (1951) 1301; 5 (1951) 1410; 7 (1953) 159.
- ¹⁶ W. LOTMAR, *Helv. Chim. Acta*, 32 (1949) 1847; *Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta*, 39 (1952) 216; *Plasma*, 1 (1953) 209; *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 603.
- ¹⁷ H. J. ANTWEILER, *Kolloid Z.*, 115 (1949) 130; *Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta*, 36/37 (1951) 561; *Chem.-Ing.-Tech.*, 24 (1952) 284.
- ¹⁸ E. WIEDEMANN, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 82; 35 (1952) 1895; 35 (1952) 2314; E. WIEDEMANN, in: HOPPE-SEYLER-THIERFELDER, *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, 10. Aufl., Bd. I, Springer, Berlin, 1953, S. 54; E. WIEDEMANN, *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 5 (1954) 1.
- ¹⁹ T. SVEDBERG UND A. LYSHOLM, *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsaliensis*, Vol. extra ord. (1927) 1-24.
- ²⁰ T. SVEDBERG UND K. O. PEDERSEN, *Die Ultrazentrifuge*, Theodor Steinkopff, Dresden und Leipzig, 1940; Clarendon Press, Oxford, 1940.
- ²¹ J. W. BEAMS UND S. A. BLACK, *Rev. Sci. Instr.*, 10 (1939) 59; E. G. PICKELS, *Rev. Sci. Instr.*, 13 (1942) 93; *Chem. Revs.*, 30 (1942) 341; *Machine Design*, (1951).
- ²² E. WIEDEMANN, *Chem.-Ing.-Tech.*, 28 (1956) 263; *Dechema Monograph.*, 26 (1956) 333; *Chem. Rundschau (Solothurn)*, (1956).
- ²³ E. G. PICKELS, W. F. HARRINGTON UND H. K. SCHACHMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 38 (1952) 943.
- ²⁴ G. MEYERHOFF, *Makromol. Chem.*, 15 (1955) 68.
- ²⁵ L. I. MILCH, *Lab. Invest.*, 2 (1953) 441.
- ²⁶ L. MICHAELIS, *Biochem. Z.*, 16 (1909) 81.
- ²⁷ E. WIEDEMANN, in: HOPPE-SEYLER-THIERFELDER, *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, 10. Aufl., Bd. I, Springer, Berlin, 1953, S. 85.
- ²⁸ E. WIEDEMANN, *Sci. Pharm.*, 17 (1949) 45.
- ²⁹ Grösstenteils unpubl., vergl. hierzu: E. WIEDEMANN, *Klin. Wochschr.*, 31 (1953) 933.

QUANTITATIVE IMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON
PLASMAPROTEINEN

H. E. SCHULTZE UND G. SCHWICK

Behringwerke AG, Marburg/L. (Deutschland)

Die Ergebnisse der chemischen Analyse isolierter Plasmaproteine lehren uns, die einzelnen Eiweisskörper unseres Blutplasmas als Makromoleküle bestimmter Grösse mit konstantem Peptid-, Kohlenhydrat- oder Lipoidgehalt zu betrachten. Zusätzlich weisen die neuen Befunde chromatographischer und fermentchemischer Untersuchungen darauf hin, dass die Reihenfolge der Aminosäuren in den Peptidketten ein besonders charakteristisches Strukturelement für Plasmaproteinindividuen ist. Die Art der Anordnung der Aminosäuren im Peptidgefüge ist aber auch die hauptsächlichste Ursache der immunologischen Spezifität und der Artspezifität der *Plasmaproteine*.

Daher ermöglichen immunchemische Verfahren eine empfindliche Unterscheidung der einzelnen Plasmaproteine und eine exakte Auskunft über die Art des Produzenten. Dies zeigen die Arbeiten GRABARS¹ über das immunologische Verhalten der Plasmaproteine bei der Geldiffusion und der Immunoelktrophorese, die bereits den Nachweis von 18 verschiedenen Proteinindividuen im menschlichen Plasma gestatten.

Für den *quantitativen* Ausbau der immunchemischen Methode gilt das Verfahren von HEIDELBERGER^{2, 3}, den N-Gehalt in isolierten Immunpräzipitaten zu ermitteln, wegen seiner grossen Genauigkeit als besonders aussichtsreich. Auch wir wandten es mit Erfolg an, bedienten uns aber aus Gründen der Zeitersparnis eines spektralfotometrischen Verfahrens für quantitative Trübungsmessungen von Antigen-Antikörperreaktionen, das bereits von verschiedenen Autoren angewandt⁴⁻⁷ und in neuerer Zeit auch für die speziellen Belange der immunologischen Plasmaproteinbestimmung⁸⁻¹⁵ ausgearbeitet wurde. Als Reagenzien verwandten wir dabei hochwertige Antiseren, die wir durch Immunisieren von Kaninchen mit einer grösseren Zahl isolierter menschlicher Plasmaproteine von einem hohen Reinheitsgrad erhielten.

Wir verfolgten mit diesen Arbeiten das Ziel, die einzelnen Proteine des Plasmas genauer zu erfassen als es mit den verschiedenen elektrophoretischen Verfahren der Gruppenanalyse zur Zeit möglich ist. Erfreulicherweise erwies sich die benutzte Methode als gut reproduzierbar und sehr empfindlich. Schon die ersten Vorversuche zeigten, dass der Einsatz der quantitativen immunologischen Bestimmungsverfahren zur Klärung folgender Probleme von grossem Nutzen ist:

- 1) der *Altersabhängigkeit* der Proteinzusammensetzung beim Gesunden
- 2) der pathologischen Gehaltsverschiebungen (Dysproteinämie)
- 3) der Entdeckung und quantitativen Erfassung pathologischer Fehlsteuerungen der Eiweissynthese (Paraproteinämie)

4) der Ermittlung immunologisch verwandter Proteine (Klärung genetischer Zusammenhänge)

5) der quantitativen immunologischen Bestimmung von Begleitproteinen in hochgereinigten Proteinen.

TABELLE I

CHEMISCHE UND PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN ISOLIERTER
HUMAN-PLASMAPROTEINE

Protein	Ultrazentr.		Elektrophorese		% Stickstoff	% Kohlenhydrate					% Lipoid
	$S_{20}^{1,5\%}$	Rel. %	Aufnahmen n. 91,4° absteigend	$-u \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ absteigend		Hexosen	Fucose	N-Acetyl-hexosamin	N-Acetyl-sialinsäure	Hexuronsäure	
Präalbumin		4,1 -		9,0 10,1	-	1,1	0	0,15	0	0	-
Albumin		4,0 100		6,7 7,3	16,0	0,05	0	0,03	0	0	0,2
Coerulopl.		7,1 2 10,8 94 4		5,6 6,4	14,4	3,0	0,18	2,4	1,9	0,23	0
α_2 -Makrogl.		19,5 2 98		4,3 4,9	14,8	3,6	0,14	2,9	1,8	0,13	0
Transferrin		5,0 100		3,3 3,5	15,4	2,4	0,07	2,0	1,4	<0,05	0
Fibrinogen		7,1 >95 9,2 Spur 21,3 Spur		2,1 2,2	-	1,1	0	1,0	0,7	-	1,8
γ -Globulin		6,5 96 4		1,2 1,3	16,0	1,1	0,2	1,2	0,3	0,15	0,2
α_2 -Lipopr.		S_{126}^{17} D=1063			-	1,1	0,08	0,2	0,2	-	88,4
β -Lipopr.		S_{126}^8 D=1063			-	0,9	0	0,4	0,3	-	71,9

*Coeruloplasmin in Phosphat-Puffer p_H 7,4, $\mu=0,15$ untersucht, die anderen Proteine in Longworth-Puffer p_H 8,6, $\mu=0,1$.

METHODE

1. Reagenzien und Apparate

a) Präzipitierende Anti-Proteinseren vom Kaninchen. Zur Gewinnung spezifischer Anti-Proteinseren immunisierten wir Kaninchen verschiedener Rassen und einem durchschnittlichen Gewicht von 2–3 kg mit den in Tabelle I angeführten Reinproteinen^{16–22}. Dabei wurde kein einheitliches Immunisierungsschema verwandt. Im allgemeinen erhielten die Tiere aber innerhalb der ersten 8–10 Tage kleine Dosen des

Literatur S. 25

jeweiligen Proteins intravenös verabreicht, während bei späteren Nachimmunisierungen im Abstand von mehreren Tagen grössere Antigenmengen zusammen mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gel subcutan appliziert wurden.

Etwaige unspezifische Antikörper ermittelten wir mit Hilfe des Geldiffusionstestes nach OUCHTERLONY^{23, 24} und der Immunelektrophorese nach GRABAR¹ und SCHEIDEGGER²⁵ und entfernten sie durch Adsorption an das jeweilige Begleitprotein aus dem Antiserum.

b) *Verdünnungsflüssigkeit von pH 7.5 für Antigen und Antiserum.* 11.9 g Na_2HPO_4 und 9.1 g KH_2PO_4 lösten wir in je 1 l physiologischer NaCl-Lösung. Dann fügten wir zu 85.2 ml der M/15 Na_2HPO_4 -Lösung 14.8 ml M/15 KH_2PO_4 -Lösung*.

c) *Spektralfotometer.* Wir verwandten das Beckman-Spektralfotometer Du und das Zeiss-Opton-Spektralfotometer PMQ II und führten die Messungen in Mikroküvetten von 0.8 ml Inhalt (\varnothing 10 mm) durch.

2. Aufstellung von Bezugskurven für die quantitative Proteinbestimmung.

Zur Anlegung von Eichkurven versetzten wir abgestufte Mengen des jeweiligen Proteinantigens mit dem aus Tabelle I ersichtlichen Reinheitsgrad in 0.05 ml Puffer mit einer im Kontroll- und Analysenansatz konstant zu haltenden Antiserumverdünnung (0.5 ml) und liessen 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen, worauf dann bei 450 m μ im Spektralfotometer die durch die Immunpräzipitation verursachte Trübung gemessen wurde. Eine Berücksichtigung des Antigens war wegen seiner grossen Verdünnung im allgemeinen nicht erforderlich. Der Verlauf der Präzipitatkurven wird durch vier Beispiele in Fig. 1 veranschaulicht.

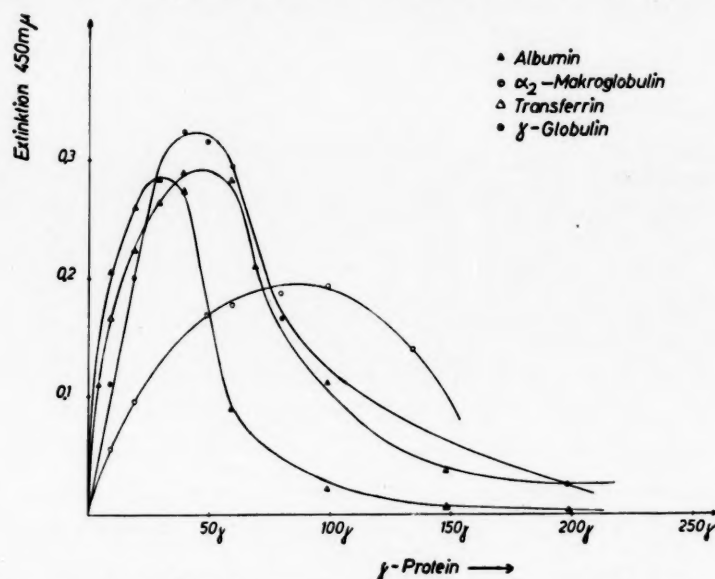


Fig. 1. Bezugskurven für die immunologische Bestimmung von Serumproteinen.

Man sieht, dass die Immunpräzipitate im Überschuss des Antigens löslicher werden. Nur der aufsteigende Kurvenast ist für quantitative Proteinbestimmungen

* Für die Bestimmung von α_2 - und β -Lipoprotein erwies es sich als zweckmässig, die Lipoproteine oder das zu prüfende Serum und das jeweilige Antiserum statt in einer M/15 Phosphatpuffer-Kochsalz-Lösung in einer 0.01 M Phosphatpufferlösung in 8% Kochsalz zu verdünnen. Es zeigte sich, dass in Gegenwart von 8% Kochsalz die Lipoprotein-Antilipoprotein-Präzipitate stabiler und besser messbar sind.

als Bezugssystem geeignet. Auf ihm lassen sich brauchbare Messbereiche abgreifen, die in Tabelle II angeführt sind und deren Extinktionen in einem doppelt logarithmischen Koordinatensystem eine Gerade ergeben.

Die Verdünnung des Antiserums hängt vom Antikörpertiter des Serums ab. Sie schwankt bei unseren Bestimmungen zwischen 1 : 5 und 1 : 10. Einzelheiten sind der Tabelle II zu entnehmen, in der auch die Messbereiche für alle von uns untersuchten Immunpräzipitatkurven eingetragen sind.

TABELLE II

<i>System</i>	<i>Messbereich (μg)</i>	<i>Antiserum- Verdünnung</i>
Präalbumin (tryptophanr.) – Anti-Präalbumin	0–4.5	1 : 5
Albumin – Antialbumin	0–25	1 : 10
Coeruloplasmin – Anti-Coeruloplasmin	0–4.5	1 : 5
α_2 -Makroglobulin – Anti- α_2 -Makroglobulin	0–25	1 : 10
α_2 -Lipoprotein – Anti- α_2 -Lipoprotein	0–4.0	1 : 5
β -Lipoprotein – Anti- β -Lipoprotein	0–45	1 : 8
β_1 -metallb. Globulin – Anti- β_1 -metallb. Globulin	0–35	1 : 10
Fibrinogen – Anti-Fibrinogen	0–30	1 : 5
γ -Globulin – Anti- γ -Globulin	0–40	1 : 10

3. Ausführung der Bestimmung

Es werden 0.05 ml einer bestimmten Verdünnung des zu untersuchenden Serums von bekanntem Eiweissgehalt (Biuret-Bestimmung) in der Küvette mit 0.5 ml Antiserumverdünnung gemischt, 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und im Spektralfotometer bei 450 $m\mu$ gegen einen Leerwert, 0.05 ml Puffer + 0.5 ml Antiserum gemessen. Je nach der Eigenfärbung des Testserums wird noch ein zweiter Leerwert, 0.05 ml Testserum + 0.5 ml Puffer, mitgemessen.

Die Verdünnung des zu analysierenden Plasmas oder Serums muss so gewählt werden, dass die mit ihr ermittelten Extinktionen in den Messbereich der Bezugskurven fallen. Deshalb ist eine Berücksichtigung der ungefähren Konzentration des zu bestimmenden Proteins notwendig. Bei stark pathologischen Proteinveränderungen im Serum können hierzu die Werte der Papierelektrophorese herangezogen werden. Für die von uns angewandten Systeme erwiesen sich bei Verwendung der zuvor genannten optimalen Antiserumverdünnungen nachstehende Plasma- oder Serumverdünnungen als geeignet. (Tab. III)

TABELLE III

	<i>Plasma-oder Serumverdünnung</i>	<i>Erfassbare Proteinmenge (μg)</i>	<i>% Anteil v. Gesamt- serumproteingehalt</i>
Präalbumin	1 : 10	1.0-4	0.2-0.5
Albumin	1 : 400	0.5-14	2.5-67.5
Coeruloplasmin	1 : 30	0.5-4	0.2-1.5
α_2 -Makroglobulin	1 : 50	0.6-12	0.3-7.5
α_2 -Lipoprotein	1 : 30	0.5-4	0.2-1.5
β -Lipoprotein	1 : 30	5.0-42	1.8-16.0
β_1 -metallb. Glob.	1 : 30	0.5-20	0.2-7.5
γ -Globulin	1 : 100	0.5-19	0.6-24.0
Fibrinogen	1 : 20	1.0-33	0.3-8.5

Bei Seren bzw. Plasmen mit stark erhöhtem γ -Globulingehalt empfiehlt es sich, eine Doppelbestimmung mit zwei verschiedenen Serumverdünnungen auszuführen, da bei der Testung mit nur einer Serumverdünnung übersehen werden kann, wenn man in die Zone des Antigenüberschusses eingetreten ist.

Die beim Analysengang einzuhaltenden Volumina und Reaktionszeiten entsprechen denen, die für die Aufstellung der Eichkurven angegeben wurden.

Beispiel für die immunologische Bestimmung des Albumins im Normal-Serum (Gesamteiweissgehalt 8%).

Analysenansatz: 0.05 ml Normalserumverdünnung 1 : 400
+ 0.5 ml Antialbuminserumverdünnung 1 : 10

Extinktion: 0.33

Leerwert: 0.05 ml Puffer + 0.5 ml Antiserum*

Extinktion: 0.08

Nach Abzug des Leerwertes ergibt sich also eine Extinktion von 0.25, die, in der Bezugskurve für Albumin abgelesen, einer Albuminmenge von 10 μ g entspricht. Die Berechnung der absoluten Albuminmenge in dem untersuchten Normalserum wird wie folgt vorgenommen:

$$\text{Gefundene Proteinmenge} \times \text{Serumverdünnung} \times \text{Ansatzverdünnung} \\ = \text{mg Protein/ml Serum};$$

also für das obige Beispiel:

$$10 \times 400 \times 11 = 44 \text{ mg Albumin/ml Serum.}$$

Die Berechnung des relativen, auf den Gesamteiweissgehalt des Serums bezogenen Proteingehalts erfolgt nach der nachstehenden Formel:

* Im allgemeinen wird gegen diesen Leerwert gemessen, so dass diese Extinktion automatisch in Abzug gebracht wird.

Literatur S. 25

$$\frac{\text{Gefundene Proteinmenge} \times \text{Serumverd\u00fcnnung} \times \text{Ansatzverd\u00fcnnung} \times 100}{\text{Proteingehalt in 1 ml Serum}} =$$

$$= \% \text{ Protein vom Gesamteiweiss};$$

also f\u00fcr das Beispiel:

$$\frac{10 \times 400 \times 11 \times 100}{80} = 55\% \text{ Albumin}$$

4. Erfassungs- und Streubreite der Methode – Ermittlung der Normalwerte.

In einem Versuch, dessen Ergebnis die Fig. 2 wiedergibt, f\u00fchrten wir eine vergleichende Bestimmung der Proteine im Normalserum unter Verwendung des quantitativen Immunpr\u00e4zipitationsverfahrens nach HEIDELBERGER^{2, 3} und mit der fotometrischen Bestimmung durch. Die einzelnen Versuchsans\u00e4tze waren gleich gross und enthielten je 1 ml Antiserumverd\u00fcnnung 1 : 10. Die Masst\u00e4be wurden in der Fig. 2 aufeinander abgestimmt. Wie aus der Darstellung hervorgeht, wurden mit beiden Methoden \u00e4hnliche Pr\u00e4zipitatkurven erhalten. Dass die fotometrischen Kurven mitunter sch\u00e4rfer sind, ist ein Zeichen daf\u00fcr, dass langsam aggregierende Antigen-Antik\u00f6rperverbindungen durch die besonderen Versuchsbedingungen des fotometrischen Verfahrens nicht erfasst werden.

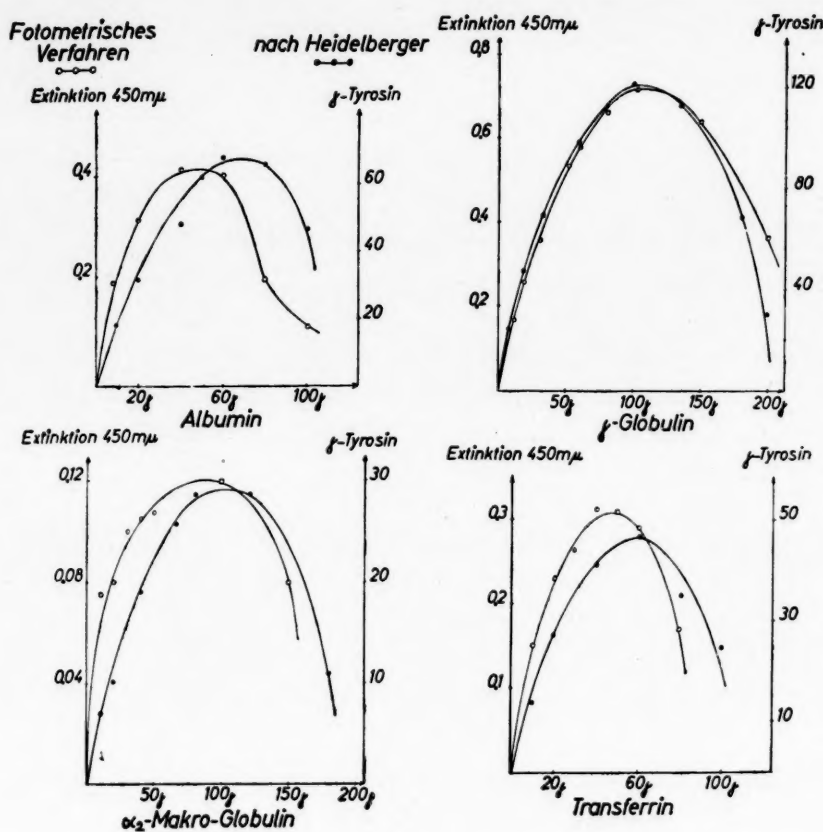


Fig. 2. Vergleich der quantitativen Immunpr\u00e4zipitatbestimmung nach HEIDELBERGER und dem fotometrischen Verfahren.

In einigen Normalseren, die innerhalb des Normalbereiches extreme Eiweissverschiebungen aufweisen, stellten wir der immunologischen Bestimmung von 5 Serumproteinen jeweils die Kontrollbestimmung mit einem anderen Bestimmungsverfahren gegenüber. Im Falle des Albumins und γ -Globulins stimmten die Werte der immunologischen Bestimmung mit denen der papierelektrophoretischen relativ gut überein. Für die Kontrollbestimmung des Transferrins, die über das Eisenbindungsvermögen des Serums erfolgte, verwandten wir die Methode nach DAVIES, LEVIN UND OBERHOLZER²⁶. Auch dieses Beispiel spricht für die Zuverlässigkeit der immunologischen Methode. Dasselbe beweist die Bestimmung des α_2 -Makroglobulins, bei der wir zur Kontrolle eine Analyse in der Ultrazentrifuge vornahmen. Zur Überprüfung der immunologischen Bestimmung des Coeruloplasmins analysierten wir in fünf Seren das gebundene Kupfer nach EDEN UND GREEN²⁷ und GUBLER *et al.*²⁸. Auch hier ist die Übereinstimmung zwischen der chemischen und der immunologischen Bestimmung befriedigend (Tab. IV).

TABELLE IV

VERGLEICHE VON ERGEBNISSEN DER IMMUNOLOGISCHEN PLASMAPROTEINBESTIMMUNGEN MIT DENEN ANDERER BESTIMMUNGSMETHODEN

Normal-serum	Albumin		γ -Globulin		Transferrin	
	Immunolog. Bestimmung %	Papier-elektrophorese %	Immunolog. Bestimmung %	Papier-elektrophorese %	Immunolog. Bestimmung %	Transf.inbest. ü. Eisenb.-Vermögen %
1	64.3	67.5	12.7	11.5	4.9	4.7
2	53	55.4	22.3	21.9	3.5	3.3
3	61	63.5	19.2	20.2	4.9	4.6
4	53.6	56.9	15.4	15.3	4.4	3.9

Normal-serum	α_2 -Makroglobulin		Coeruloplasmin	
	Immunolog. Bestimmung %	Mit d. Ultrazentr. best. Makroglob.-Frakt. %	Immunolog. Bestimmung %	Gebundenes Kupfer $\mu\text{g}/\%$
1	3.8	2.5	0.14	96
2	1.6	1.0	0.31	113
3	1.8	1.8	0.3	113
4			0.2	102
5			0.1	56

Die Durchschnittswerte der Immunanalyse von Präalbumin, Albumin, Coeruloplasmin, α_2 -Makroglobulin, Transferrin, α_2 -Lipoprotein, β -Lipoprotein und γ -Globulin im Serum von 25 normalen Erwachsenen verschiedenen Alters werden in Tabelle V wiedergegeben.

Ausser Albumin und γ -Globulin, die etwa grössenordnungsmässig in den Bereich der durch die elektrophoretische Bestimmung ermittelten Albuminfraktion und γ -Globulinfraktion fallen, liegen auch die für die anderen Proteine immunchemisch bestimmten Werte im Bereich der in der Literatur für diese Proteine bisher angeführten Konzentrationswerte für Normalserum. Diese wurden für Präalbumin mit etwa 0.3%^{19, 29}, für Coeruloplasmin mit 0.5%³⁰, für α_2 -Makroglobulin mit 1.5–2%³¹, für Transferrin mit 3%³², für α_2 -Lipoprotein mit 0.7%³³ und für β -Lipoprotein mit 5%³² angegeben.

TABELLE V

DURCHSCHNITTSWERTE DER IMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG NORMALER PLASMAPROTEINE IM SERUM ERWACHSENER UND STREUBREITE DER METHODE

Durchschn. Werte von 25 Erwachsene- nenserern (20-50 J.)	Tryptophan- reiches Präalbumin	Al- bumin	Coerulo- plasmin	α_2 -Makro- globulin	α_2 -Lipo- protein	β -Lipo- protein	Trans- ferrin	γ -Glo- bulin
mg/ml/Serum	0.3	48.3	0.3	2.4	0.7	6.6	4.0	14.8
% vom Gesamteiweiss	0.3	57.5	0.3	2.8	0.9	7.8	4.9	18.1
Normalbereich %	0.1-0.5	50-65	0.2-0.3	1.5-4.5	0.5-1.5	4-14	3-6.5	13-22

Mittlere Streubreite der Methode:

$\sigma = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n-m}}$	Quantitative immu- nolog. Bestimmung	Albumin ± 2.2 %	α_2 -Makroglob. ± 0.2 %	Transferrin ± 0.22 %	γ -Globulin ± 0.64 %
	Papierelektrophorese	Albumin ± 1.32%	α_1 -Glob. ± 0.34%	α_2 -Glob. ± 0.55%	β -Glob. ± 0.61%

$n = 10$

$m = 1$

Aus der gleichen Tabelle V geht auch die Streubreite bzw. die Fehlergrenze der Methode hervor. Zu ihrer Berechnung führten wir mit demselben Serum 10-mal die gleichen Bestimmungen durch. Wie aus den zum Vergleich unter denselben Verhältnissen errechneten Werten der Papierelektrophorese hervorgeht, ist die Fehlerbreite der quantitativ-immunochemischen Serumproteinbestimmung nicht grösser als die der Papierelektrophorese. Die benötigten Serummengen betragen für die Papierelektrophorese etwa 0.01 ml, für das quantitativ-immunologische Verfahren je nach der Titerhöhe des Antiserums 0.001-0.05 ml Serum oder Plasma.

ERGEBNISSE

1. Bei Gesunden sind die gefundenen Mengen relativ konstant. In den ersten Lebenstagen und im Alter kommen beträchtliche Schwankungen vor.
2. Besonders hochmolekulare Proteine wie das α_2 -Makroglobulin, das α_2 - und das β -Lipoprotein sind unmittelbar nach der Geburt mässig, bei *Nephrose* sehr stark erhöht.
3. Bei *Agammaglobulinämie* und *Analbuminämie* sind ausser diesen Makroglobulinen auch Coeruloplasmin und Transferrin geringgradig vermehrt.
4. Transferrin ist bei *Nephrose* stark vermindert, Coeruloplasmin dagegen nicht.
5. γ -, β - und α_2 -Plasmocytom enthalten normale und abgewandelte γ -Globuline in schwankenden Mengen. Der Abartungskoeffizient scheint bei β - und α_2 -Plasmocytom grösser zu sein als bei γ -Plasmocytom.
6. Das tryptophanreiche Präalbumin ist bei der Geburt erhöht, es ist nicht nachweisbar bei gestörter γ -Globulinsynthese (*Agammaglobulinämie*, *Plasmocytom* und *Makroglobulinämie*).
7. Mit Hilfe eines spezifischen Antiserums gelingt es, nicht gerinnbare Derivate des *Fibrinogens* im Plasma und Serum nachzuweisen.
8. Die Methode erlaubt die annähernde Bestimmung von sehr kleinen Mengen (0.02%) von Begleitproteinen in gereinigten Plasmaproteinen.

Literatur S. 25

Die Tabelle VI bringt ein Beispiel für die immunologische Analyse von Begleitproteinen in hochgereinigten Plasmaproteinen. Die analytische Nachweisgrenze liegt bei etwa 1/100%.

TABELLE VI

QUANTITATIVE IMMUNOLOGISCHE BESTIMMUNG VON BEGLEITPROTEINEN IN HOCHGEREINIGTEN PROTEINPRÄPARATEN

Proteinpräparate	Op. Nr.	Immunol. ermitt. %-Gehalt an:					
		Präalbumin	Albumin	Coeruloplasmin	α_2 -Makroglobulin	Transferrin	γ -Globulin
Tryptophanr. Präalbumin	14		1.15				
Albumin	1186 III	~0.06		~0.03	~0.05	~0.03	~0.04
Coeruloplasmin	1257/63	~0.06	~0.25		~0.19	~0.27	0.33
α_2 -Makroglobulin	1106	~0.35	~0.07	0.22		~0.41	2.8
Transferrin	995/1016	~0.011	~0.01	~0.055			
γ -Globulin	1204/10b	0.077	~0.025	0.011	0.026	0.012	

Die Tatsache, dass so kleine Proteinmengen analytisch erfasst werden können, ist ein überzeugender Beweis für die grossen strukturellen Unterschiede der Proteine des menschlichen Plasmas, die letzten Endes die Voraussetzung für ihre quantitative immunologische Bestimmung sind. Andererseits beeinträchtigt die Anwesenheit von Begleitproteinen die Herstellung spezifischer Antiseren, da sie Anlass zur Bildung unerwünschter Begleitantikörper gibt. Grundsätzlich sind daher nur sogenannte adsorbierte Antiseren geeignet, bei denen die störenden Antikörper durch eine Vorbehandlung mit den homologen Antigenen entfernt werden. Zur Zeit ist die Vorabsorption noch nicht in der zu erstrebenden Breite möglich, weil die Zahl der mit befriedigendem Reinheitsgrad isolierten Plasmaproteinen noch relativ gering ist.

Wenn sich trotzdem schon heute Möglichkeiten für eine erfolgreiche Bearbeitung der schwierigen immunologischen Plasmaproteinanalyse abzeichnen, so beruht das vor allem darauf, dass unter den besonderen Versuchsbedingungen der fotometrischen Registrierung von Antigen-Antikörperreaktionen nur das Hauptaggregat, bei dem beide Komponenten in einem optimalen Mengenverhältnis stehen, erfasst wird.

Die Grenzen der Methode sind dadurch gegeben, dass geringgradige, in der Immunoelktrophorese erkennbare Veränderungen, z.B. bei den γ -Globulinen, durch eine Antigen-Antikörperreaktion in wässrigem Milieu nicht erfasst werden. Die Immunoelktrophorese bietet aufgrund der Kombination von Elektrophorese, Diffusion und Immunpräzipitation grössere Möglichkeiten der qualitativen Differenzierung. Immerhin ist es bereits heute möglich, 9 Plasmaproteine spezifisch immunologisch zu bestimmen und damit einen Fortschritt gegenüber der elektrophoretischen Gruppenanalyse zu erreichen.

Die Fig. 3 veranschaulicht abschliessend das bisher erreichte Gesamtergebnis und eröffnet die Aussicht, eine Reihe weiterer Plasmaproteine einer quantitativen proteinspezifischen Analyse zugänglich zu machen. Vom gemeinsamen Einsatz quan-

titativer immunologischer Methoden und fermentchemischer Untersuchungen neben der Immunoелеktrophorese darf man sich wohl die wesentlichste Förderung unserer derzeitigen Kenntnisse über die Zusammensetzung des normalen und pathologischen Plasmas versprechen.

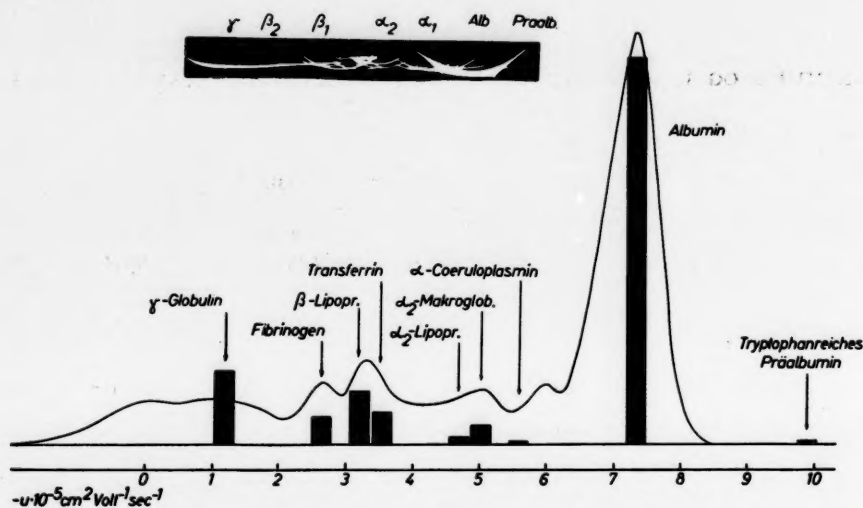


Fig. 3. Plasmaprotein-Zusammensetzung im Blickfeld immunologischer Methoden.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine quantitative immunologische Bestimmungsmethode für Plasmaproteine vorgeschlagen, mit der bisher die nachstehenden neun Einzelproteine im Plasma bestimmt werden konnten: Präalbumin (tryptophanreich), Albumin, α_2 -Makroglobulin, Coeruloplasmin, β_1 -metallbindendes Globulin (Transferrin), γ -Globulin, Fibrinogen, α_2 -Lipoprotein, β -Lipoprotein. Die benötigten Plasma- oder Serum-mengen betragen je nach dem Titer des Antiserums 0.001–0.5 ml. Die Normalwerte im Humanserum und die Fehlergrenze der Methode werden ermittelt. Anhand von Untersuchungsergebnissen bei ausgesuchten Patientenseren wird die klinische Bedeutung der quantitativen immunologischen Serumproteinbestimmung für die Diagnose von Dys- und Paraproteinämien und für die Aufklärung genetischer Beziehungen zwischen den Plasmaproteinen belegt. Die neue Methode ist auch geeignet für den Nachweis kleinster Mengen Fremdprotein in hochgereinigten Serumproteinen.

SUMMARY

QUANTITATIVE IMMUNOLOGICAL DETERMINATION OF SERUM PROTEINS

A quantitative immunological method for the determination of serum proteins is proposed, by which, for the time being, the following 9 proteins can be estimated in human sera: pre-albumin (tryptophan-rich), albumin, α_2 -macroglobulin, ceruloplasmin, β_1 -siderophilin (transferrin), γ -globulin, fibrinogen, α_2 -lipoprotein and β -lipoprotein. The plasma or serum quantities required amount to 0.001–0.5 ml, depending on the titer of the antiserum. Values in normal sera and the limits of error of the method were established. The importance of the new method for the clinical diagnosis of dys- and para-proteinaemia and for the detection of the genetic interrelation of blood proteins is demonstrated by results obtained with different pathological sera. The method is of value also for the determination of small amounts of accompanying proteins in highly purified serum proteins.

LITERATUR

- ¹ P. GRABAR UND C. A. WILLIAMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193.
- ² M. HEIDELBERGER UND F. E. KENDALL, *J. Exptl. Med.*, 55 (1932) 555.
- ³ E. A. KABAT UND M. M. MAYER, *Experimental Immunochimistry*, Charles C. Thomas, Springfield, Ill., 1948.
- ⁴ A. BOYDEN UND R. DE FALCO, *Physiol. Zool.*, 16 (1943) 229.
- ⁵ A. BOYDEN, E. BOLTON UND D. GEMEROY, *J. Immunol.*, 57 (1947) 211.
- ⁶ R. L. LIBBY, *J. Immunol.*, 34 (1938) 71.
- ⁷ C. G. POPE UND M. HEALEY, *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 19 (1938) 397.
- ⁸ P. BURTIN UND J. J. PODICALO, *Presse méd.*, 62 (1954) 1072.
- ⁹ B. F. CHOW, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 757.
- ¹⁰ E. FRICK UND L. SCHEID-SEIDEL, *Z. ges. exptl. Med.*, 129 (1957) 221.
- ¹¹ D. GITLIN, C. S. DAVIDSON UND L. H. WETTERLOW, *J. Immunol.*, 63 (1949) 415.
- ¹² D. GITLIN UND H. EDELHOCH, *J. Immunol.*, 66 (1951) 79.
- ¹³ M. GOODMAN, H. R. WOLFE UND ST. NORTON, *J. Immunol.*, 66 (1951) 225.
- ¹⁴ M. GOODMAN, D. S. RAMSEY, W. L. SIMPSON, D. G. REMP, D. H. BASINSKI UND M. J. BRENNAN, *J. Lab. Clin. Med.*, 49 (1957) 151.
- ¹⁵ R. HOIGNÉ, E. HUBER-STOLLER, G. GOLEY, F. RODRIGUEZ UND H. ISLIKER, *Schweiz. med. Wochschr.*, 88 (1958) 331.
- ¹⁶ K. HEIDE, R. SCHMIDTBERGER UND G. SCHWICK, *Behringwerk-Mitteilungen*, 33 (1957) 96.
- ¹⁷ H. E. SCHULTZE, *Behringwerk-Mitteilungen*, 26 (1952) 1.
- ¹⁸ H. E. SCHULTZE, I. GÖLLNER, K. HEIDE, M. SCHÖNENBERGER UND G. SCHWICK, *Z. Naturforsch.*, 10b (1955) 463.
- ¹⁹ H. E. SCHULTZE, M. SCHÖNENBERGER UND G. SCHWICK, *Biochem. Z.*, 328 (1956) 267.
- ²⁰ H. E. SCHULTZE, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 10 (1957) 31.
- ²¹ H. E. SCHULTZE, K. HEIDE UND H. MÜLLER, *Behringwerk-Mitteilungen*, 32 (1957) 1.
- ²² H. E. SCHULTZE, R. SCHMIDTBERGER UND H. HAUPT, *Biochem. Z.*, 329 (1958) 490.
- ²³ Ö. OUCHTERLONY, *Arkiv. Kemi, Mineral. Geol. Ser. A.*, 26B, Nr. 14 (1948).
- ²⁴ Ö. OUCHTERLONY, *Arkiv. Kemi, Mineral. Geol. Ser. A.*, 1 (1950) 55.
- ²⁵ J. J. SCHEIDEGGER, *Int. Arch. Allergy*, 7 (1955) 103.
- ²⁶ G. DAVIES, B. LEVIN UND V. G. OBERHOLZER, *J. Clin. Pathol.*, 5 (1952) 312.
- ²⁷ A. EDEN UND H. H. GREEN, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1202.
- ²⁸ C. J. GUBLER, M. E. LAHER, H. ASHENBRUCKER, G. E. CARTWRIGHT UND M. N. WINTROBE, *J. Biol. Chem.*, (1952) 196.
- ²⁹ F. W. ALY, persönliche Mitteilung, 1958.
- ³⁰ J. H. SCHEINBERG UND D. GITLIN, *Science*, 116 (1952) 484.
- ³¹ A. PETERKOWSKY, L. LEVINE UND R. K. BROWN, *J. Immunol.*, 76 (1956) 237.
- ³² E. J. COHN, F. R. N. GURD, P. M. SURGENOR, B. A. BARNES, R. K. BROWN, G. DROUAUX, J. M. GILLESPIE, F. W. KAHNT, W. F. LEVER, C. H. LIU, D. MITTELMANN, R. F. HOUTON, K. SCHMID UND E. UROMA, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 465.
- ³³ Eigene Befunde, unveröffentlicht.

IMMUNCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT PROTHROMBIN UND THROMBIN

G. SCHWICK UND H. E. SCHULTZE

Behringwerke AG, Marburg/L. (Deutschland)

Bisherige immunologische Untersuchungen bei plasmatischen Gerinnungsfaktoren erstrecken sich im wesentlichen auf den Nachweis von Antikörpern im Blut von Patienten mit hämorrhagischer Diathese, die meist infolge von Bluttransfusionen entstanden sind und eine Inhibitorwirkung gegen aktive Gerinnungsfaktoren entfalten. Diese heute auch als Immunokoagulopathie bezeichneten pathologischen Zustände werden am häufigsten durch Antikörper gegen den Faktor VIII (Anti-hämophiles Globulin)¹⁻⁴, seltener auch durch Antikörper gegen Faktor V⁵⁻⁷ und Faktor VII^{8, 9} verursacht. Der Nachweis dieser Antikörper wird meist durch gerinnungsphysiologische Untersuchungsmethoden und nur in wenigen Fällen durch immunchemische Methoden geführt, was durch die meist nur geringe Antikörperaktivität bedingt ist. Gut wirksame Antikörper gegen Faktor VIII konnten von RICHARDS UND SPAET¹⁰ durch Immunisieren von Kaninchen erhalten werden.

Durch die Immunisierung von Kaninchen mit hochgereinigtem Prothrombin aus Rinderplasma haben HALICK UND SEEGER¹¹ nachgewiesen, dass auch das Prothrombin antigenen Charakter hat. Die Autoren erhielten ein Antiserum, das Prothrombin spezifisch präzipitierte und mit dem sie bei der Prüfung von Prothrombin im Gel-Diffusionstest nach OUDIN¹² zwei Präzipitationsringe erhielten, von denen einer dem Faktor V zugeschrieben wurde, der als Spurenverunreinigung in nach SEEGER^{13, 14} hergestelltem Prothrombin enthalten ist.

Da von allen Gerinnungsfaktoren das Prothrombin heute am reinsten dargestellt werden kann und bisher am besten chemisch-physikalisch charakterisiert worden ist, erscheint es für eingehende immunologische Studien am geeignetsten. Nicht zuletzt auch deshalb, weil es als Vorstufe des eigentlichen Gerinnungsfermentes Thrombin zweifellos eine Schlüsselstellung im Gerinnungssystem einnimmt.

Wir konnten durch die über längere Zeit vorgenommene Immunisierung eines Pferdes mit reinstem, nach SEEGER^{13, 14} gewonnenem Rinder-Prothrombin ein relativ hochtitriges Antiprothrombinserum erhalten, dessen Eigenschaften wir eingehend geprüft haben und im folgenden mitteilen.

PRÄPARATE UND METHODEN

a. Prothrombin. Dieses stellen wir wie für frühere Untersuchungen^{15, 16} aus Rinderplasma nach dem Verfahren von SEEGER^{13, 14} her. Nach heute vorliegenden Untersuchungsergebnissen ist das Prothrombin ein α -Glykoprotein, dessen chemische und physikalisch-chemische Eigenschaften aus Fig. 1 zu ersehen sind.

b. Thrombin. Wie SEEGER erstmals zeigen konnte¹⁷ und wie wir bestätigten¹⁵, gelingt es, Prothrombin durch Auflösen in 25%iger Natriumcitratlösung ohne weitere

Zusätze von Aktivatoren vollständig in Thrombin zu überführen. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde von uns ein derartiges Citrat-Thrombin verwandt, dessen Eigenschaften aus Fig. 1 hervorgehen.

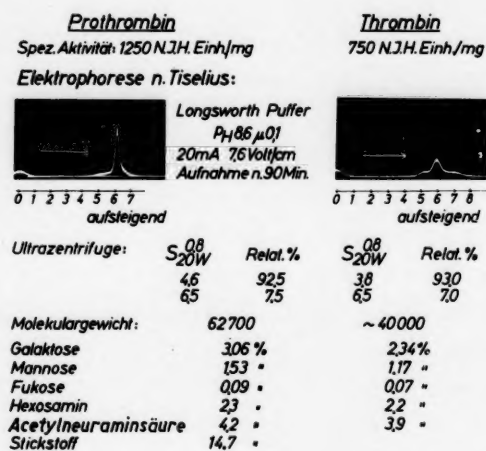


Fig. 1. Chemische und physikalisch-chemische Eigenschaften von Prothrombin und Thrombin, hergestellt aus Rinderplasma nach SEEGERs.

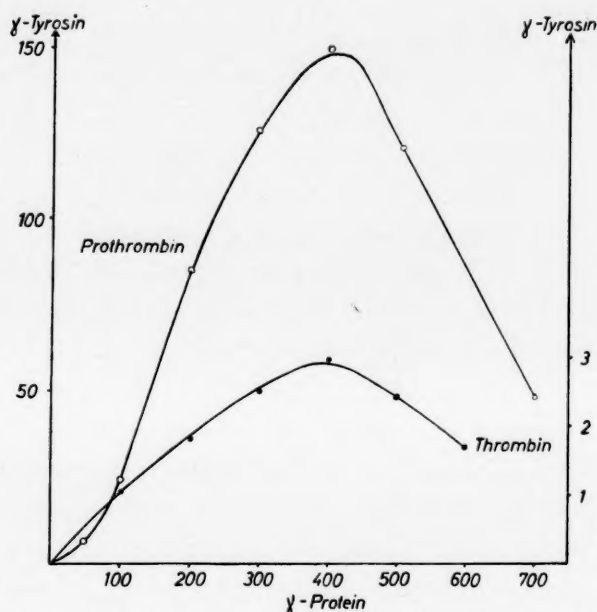


Fig. 2. Quantitative Immunpräzipitation nach HEIDELBERGER von Prothrombin und Thrombin.

c. *Antiprothrombinserum vom Pferd*. Ein Pferd Nr. 2226 wurde über drei Immunisierungsperioden mit nach SEEGERs hergestelltem Prothrombin immunisiert.

1. Immunisierungsperiode: im Abstand von vier Tagen sieben intravenöse Injektionen steigender Menge von insgesamt 875 mg Prothrombin.

2. Immunisierungsperiode: 14 Tage nach der letzten intravenösen Injektion im 5-tägigen Abstand vier subkutane Injektionen von insgesamt 1500 mg Prothrombin mit Zusatz von $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gel.

3. Immunisierungsperiode: 30 Tage nach der letzten Injektion der 2. Immunisierungsperiode drei weitere subkutane Injektionen von insgesamt 700 mg Prothrombin ohne Zusatz von $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Die Blutentnahme zur Antiserumgewinnung erfolgte 14 Tage nach der letzten Injektion. Wir injizierten also dem Pferd über einen Zeitraum von $3\frac{1}{2}$ Monaten insgesamt 3075 mg Prothrombin, eine Menge, zu deren Herstellung etwa 200 l Rinderplasma aufgearbeitet werden mussten.

Das native Antiserum wurde einem für antitoxische Seren üblichen Fermen-tierungsverfahren unterworfen und das Endprodukt auf einen Proteingehalt von 15 % aufkonzentriert.

d. *Faktor V (Accelerin) vom Rind* (Reagens der Behringswerke).

e. *Faktor VII (Convertin) vom Rind*. Rinderserum wurde mit 10% BaSO_4 adsorbiert, zentrifugiert, das BaSO_4 -Sediment zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und anschliessend mit 5% Natriumcitratlösung, pH 7.6, eluiert. Das Eluat wurde salzfrei dialysiert und lyophilisiert.

f. *Faktor VIII (Antihämophiles Globulin) vom Rind*. Hergestellt in Anlehnung an die Methode von BIDWELL¹⁸.

- g. *Faktor IX (Christmasfaktor) vom Rind*. Als Faktor IX-Quelle wurde das oben beschriebene Faktor VII-Präparat benutzt, das ausreichende Mengen Faktor IX enthält.
- h. *Faktor XI (Stuartfaktor)*. Für Faktor XI fand 1 : 20 verdünntes Rinderserum Verwendung.
- i. *Quantitative Immunpräzipitation nach HEIDELBERGER UND KENDALL*¹⁹. Für die Immunpräzipitationskurven von Prothrombin und Thrombin in Fig. 2 wurden Testansätze mit jeweils 2 ml Antiprothrombinserum verwandt.
- j. *Immuno-elektrophorese nach GRABAR in der Mikromodifikation nach SCHEIDEGGER*²⁰.
- k. *Prothrombinbestimmung nach der Zweiphasenmethode*²¹.
- l. *Thrombinbestimmung mit reinem Rinderfibrinogen*¹⁶.
- m. *Prothrombin-, Faktor V- und Faktor VII-Bestimmung nach dem spezifischen Einphasenverfahren*²².
- n. *Faktor VIII- und IX-Bestimmung*. Im Plasmathrombokinasetest^{23, 24} unter Verwendung von Hämophilie A-Plasma bzw. Hämophilie B-Serum.
- o. *Faktor XI (Stuartfaktorbestimmung)*. Unter Verwendung von Stuartfaktormangelplasma^{25, 26} und Bestimmung der Einphasengerinnungszeit.
- p. *Hexosebestimmung nach SØRENSEN UND HAUGAARD*²⁷.
- q. *Neuraminsäure-Bestimmung nach BÖHM, DAUBER UND BAUMEISTER*²⁸.

ERGEBNISSE

Der hohe Titer unseres Antiprothrombinserums ermöglicht es, eine quantitative Immunpräzipitation von Prothrombin mit ihm durchzuführen. Das in Fig. 2 graphisch dargestellte Ergebnis zeigt den für eine Antigen-Antikörperreaktion typischen Kurvenverlauf. Aus der gleichen Abbildung ist ersichtlich, dass das Antiprothrombinserum, wenn auch in sehr vermindertem Masse, Thrombin zu präzipitieren vermag. Während sich die Äquivalenzonen von Prothrombin und Thrombin in ihrem Optimum unter den Bedingungen des Testes entsprechen, wird, bezogen auf die Tyrosin-Tryptophan bzw. N-Basis, von der gleichen Menge Antiprothrombinserum nur etwa 1/50 der Prothrombinmenge an Thrombin präzipitiert.

Die Antithrombinwirkung des Antiprothrombinserums lässt sich besonders gut durch die Beeinflussung der spezifischen Fermentaktivität (Fibrinogengerinnung) nachweisen. In der Fig. 3 wird die thrombinneutralisierende Aktivität des Antiprothrombinserums durch zwei Reaktionskurven belegt. Für die Aufstellung der Kurve I wurde die Menge des Antiprothrombinserums konstant gehalten und die Thrombinmengen variiert. Interessanterweise ergibt sich, dass wie bei zahlreichen anderen Antigen-Antikörperreaktionen in der Zone des Antigen-Überschusses die Antigen-Antikörperbindung geringer wird, was in unserem Falle zu einer Verminderung der Antithrombinwirkung führt. Die zweite Reaktionskurve wurde durch die Einwirkung abgestufter Antikörpermengen auf eine konstante Thrombinmenge erhalten. Sie zeigt, dass durch eine genügend hohe Antikörperkonzentration eine bestimmte Menge Thrombin praktisch vollständig neutralisiert werden kann. Dies ist, wie aus einer kürzlich von CINADER²⁹ mitgeteilten Übersicht hervorgeht, für Fermentantikörper keineswegs die Regel. Im allgemeinen werden nämlich nur Fermente, die Makromoleküle als Substrat angreifen, durch ihre homologen Antikörper in ihrer katalytischen Wirkung vollständig neutralisiert. Enzyme, die niedermolekulare Substrate angreifen wie z.B. Penicillinase, Milchsäuredehydrogenase und β -Galaktosidase

werden dagegen, obwohl sie durch die homologen Antiseren präzipitiert werden, oft überhaupt nicht oder nur teilweise in ihrer Fermentwirkung beeinflusst. Wir können also das Thrombin, das nach neueren Untersuchungen als eine Proteinase aufzufassen ist, zu den von ihren homologen Antikörpern vollständig inhibierbaren Fermenten zählen, was in Anbetracht des hohen Molekulargewichtes seines Substrates Fibrinogen (M.G. 350,000) auch zu erwarten war.

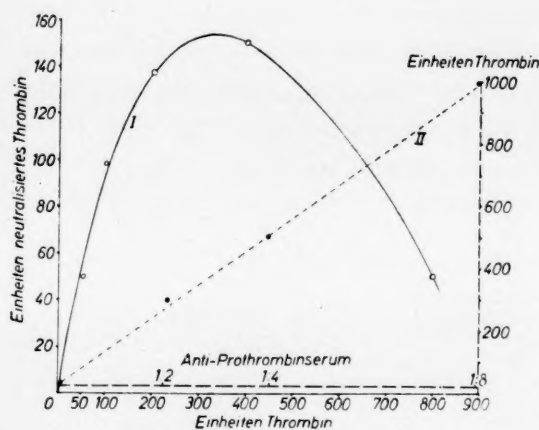


Fig. 3. Anti-Thrombinwirkung des Anti-Prothrombinserums.

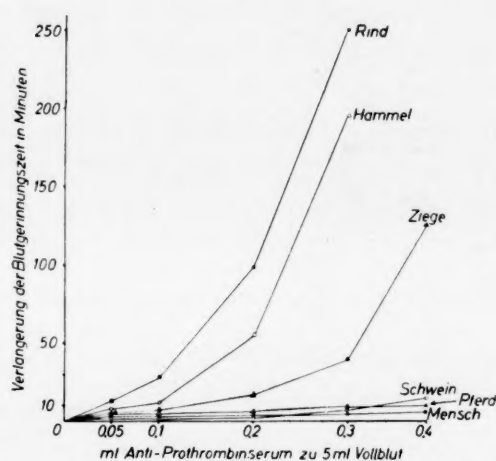


Fig. 4. Artspezifität des Anti-Rinderprothrombinserums.

Von besonderem Interesse schien uns die Klärung der Frage, inwieweit der von uns gegen Prothrombin vom Rind gewonnene Antikörper artspezifisch ist. In Ermangelung heterologer Antigene untersuchten wir die Hemmwirkung des Antiserums gegen Rinderprothrombin auf die Vollblutgerinnungszeit. Diese reagiert bekanntlich auf den Zusatz prothrombin- bzw. thrombinhemmender Substanzen wie z.B. Heparin besonders empfindlich und es hat sich gezeigt, dass bereits geringe Mengen unseres Antiprothrombinserums, die unmittelbar bei der Blutgewinnung dem Rinderblut zugesetzt werden, die Spontangerinnungszeit des Rinderblutes beträchtlich verlängern. In Fig. 4 wird der Einfluss des Antiprothrombinserums auf die Vollblutgerinnungszeit verschiedener Säugetiere und auf die des Menschen graphisch dargestellt.

Die Gerinnungszeit des Rinderblutes wird durch den Zusatz von Antiprothrombinserum ausserordentlich stark verzögert, aber auch die Vollblutgerinnungszeiten der Blutproben vom Schaf und der Ziege, die der gleichen Gattung angehören wie das Rind, erfahren eine beträchtliche Verlängerung. Die Beeinflussung der Gerinnungszeiten des Schweineblutes, Pferdeblutes und Menschenblutes, wird in der angegebenen Reihenfolge geringer. Beim Schwein, das der gleichen Ordnung wie das Rind angehört, ist zu berücksichtigen, dass es eine besonders kurze Spontangerinnungszeit aufweist, die dem Hemmeffekt des Anti-Rinderprothrombinserums stärker entgegenwirkt als die der anderen Säuger.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die bekannte Beobachtung, dass funktionell gleichwertige Proteine verschiedener Spezies sich im Antigencharakter umso ähnlicher verhalten, je mehr sie ihrer Herkunft nach miteinander verwandt sind³⁰⁻³², auch für das Prothrombin und seinen Antikörper zutrifft.

In einer weiteren Untersuchungsreihe, deren Ergebnisse in Tab. I zusammengefasst sind, wurde die Wirksamkeit des Antiprothrombinserums gegenüber Pro-

thrombin, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX und Faktor XI (Stuartfaktor) geprüft. Obgleich sich diese Untersuchungsergebnisse nicht absolut quantitativ miteinander vergleichen lassen, da es sich um verschiedene Testsysteme handelt, ist doch deutlich zu erkennen, dass für die Verlängerung der Gerinnungszeiten der Prothrombin-, Faktor VII- und Faktor IX-Bestimmung sehr viel weniger Antiprothrombinserum benötigt wird als für die anderen Systeme. Als Gesamtergebnis kann aus den Untersuchungen entnommen werden, dass das Antiprothrombinserum eine erhebliche Anti-Faktor VII- und -Faktor IX-Wirkung besitzt, eine relativ betrachtet mittelstarke Wirkung gegenüber Faktor XI, eine schwache Faktor V-neutralisierende und eine sehr schwache Faktor VIII-neutralisierende Wirkung. Auf die mögliche Bedeutung dieser Befunde für die Diskussion neuerer Anschauungen über den Blutgerinnungsmechanismus wird später noch einmal eingegangen werden.

TABELLE I

WIRKSAMKEIT VON ANTIPROTHROMBINSERUM GEGENÜBER PROTHROMBIN, FAKTOR V, FAKTOR VII, FAKTOR VIII, FAKTOR IX UND FAKTOR XI

	Antiprothrom- binserum (Gamma- AK-protein)	Gerin- nungs- zeit (sec)		Antiprothrom- binserum (Gamma- AK-protein)	Gerin- nungs- zeit (sec)
Prothrombin	ohne	35	Faktor VIII	ohne	17
Methode unter <i>m</i>	10	37	Methode unter <i>n</i>	15000	18
	100	71		30000	20
	300	über 600		45000	25
Faktor V	ohne	39	Faktor IX	ohne	15
Methode unter <i>m</i>	3750	50	Methode unter <i>n</i>	60	22
	5000	80		150	27
	7500	110			
Faktor VII	ohne	38	Faktor XI (Stuartf.)	ohne	45
Methode unter <i>m</i>	30	41	Methode unter <i>o</i>	750	68
	150	80		1200	93
	750	über 600		1500	125
				3000	600

Nachdem wir nun zunächst die Eigenschaften des Antiprothrombinserums untersucht hatten, fanden wir es interessant, einmal die verschiedenen Phasen der Prothrombinumwandlung in Thrombin immunologisch zu überprüfen und zwar wählten wir hierfür das System der Citrat-Umwandlung von Prothrombin nach

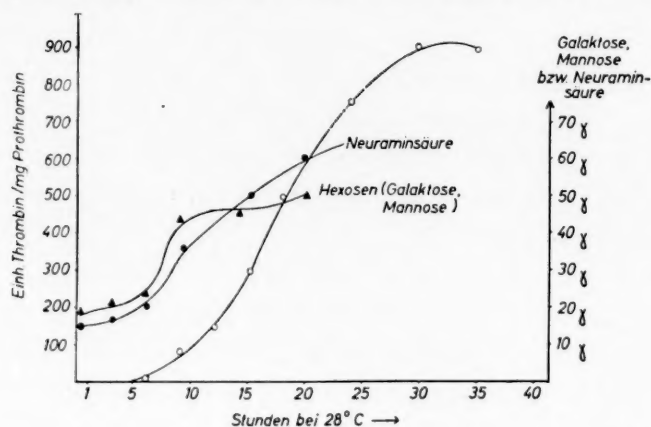


Fig. 5. Citrat-Umwandlung von Prothrombin nach SEEGERs unter Kontrolle trichloressigsäure-
abspaltbarer Kohlenhydrate.

SEEGERS¹⁷. Hochgereinigtes Prothrombin, das in 25%iger Natriumcitratlösung aufgelöst wird, wandelt sich innerhalb von 24 bis 48 Stunden in Thrombin um. Wie LORAND, ALKJAERSIG UND SEEGERS^{33, 34} zeigen konnten, nimmt in der ersten Phase dieser Citrataktivierung, in der noch kein Thrombin gebildet wird, der Anteil der vom Prothrombin durch Trichloressigsäure abspaltbaren Kohlenhydrate zu.

Unsere eigenen Befunde bestätigen die Ergebnisse von SEEGERS und zeigen, wie aus Fig. 5 hervorgeht, darüber hinaus, dass während der "Dissociationsphase" eine kontinuierliche Abspaltung von *Acetylneuraminsäure* stattfindet.

Kürzlich gelang uns der Nachweis³⁵, dass die Abspaltung von Neuraminsäure bei Glykoproteinen durch *Neuraminidase* zu einer Immunoelktrophoretisch nachweisbaren Verlangsamung der elektrophoretischen Beweglichkeit führt, ohne dass das Vermögen der Proteine, spezifisch zu präzipitieren, merklich beeinflusst wird. Bei der immunoelktrophoretischen Kontrolle der Citrataktivierung von Prothrombin, die wir in Fig. 6 zeigen, konnten wir in der "Dissociationsphase" ein ähnliches Verhalten des Prothrombins beobachten wie es Glykoproteinen nach Neuraminidasebehandlung eigen ist. Bei Betrachtung der immunoelktrophoretischen Bilder in Fig. 6 muss berücksichtigt werden, dass nur die stärkste Präzipitatlinie für das Prothrombin typisch ist, während kleinere Spurenpräzipitate, vor allem ein schneller wanderndes α_1 -Globulin, Verunreinigungen aus dem Rinderserum darstellen.

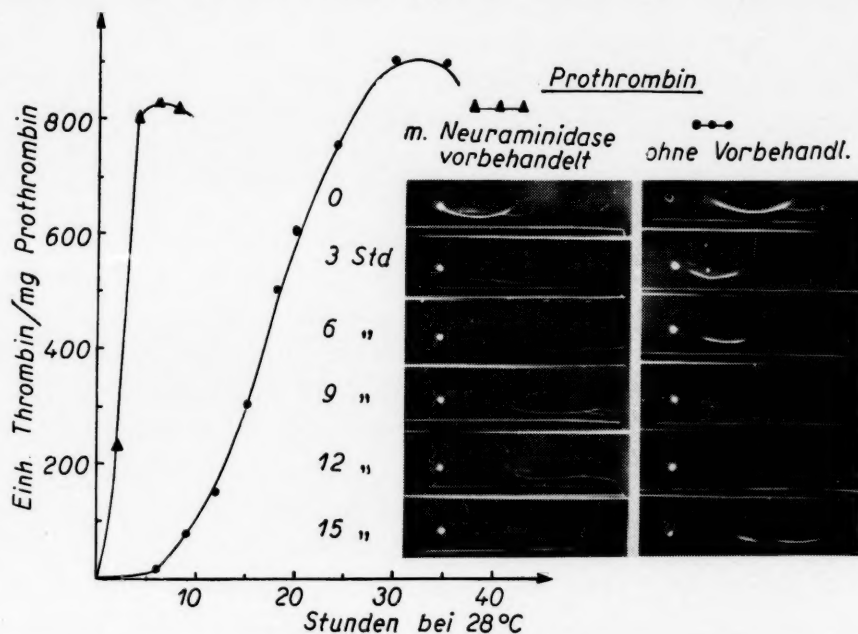


Fig. 6. Immunoelktrophoretische Kontrolle der Citratumwandlung von Prothrombin und neuraminidasevorbehandeltem Prothrombin.

Zu einem Zeitpunkt, in dem noch kein Thrombin nachweisbar ist, verlangsamt sich die elektrophoretische Beweglichkeit des Prothrombins³⁶ ohne Beeinträchtigung der Präzipitierbarkeit durch das Immunsrum. Erst nach Beginn der eigentlichen "Aktivierungsphase" treten mit dem Nachweis der ersten kleinen Thrombinmengen tiefgreifende Veränderungen des Präzipitationsbildes auf. Die ursprüngliche Prothrombin-Präzipitatlinie teilt sich in mindestens 4 immunologisch nur noch sehr schwach präzipitierbare Komponenten auf, die mit zunehmender Inkubationszeit elektrophoretisch beweglicher werden. Diese elektrophoretische Heterogenität des Thrombins ist bereits aus Untersuchungen mit der Tiseluselektrophorese³⁷ bekannt.

Die Zunahme der elektrophoretischen Beweglichkeit dürfte zum Teil durch die Molekülverkleinerung des Thrombins gegenüber dem Prothrombin bedingt sein und zwar wurden von WAUGH³⁸ bei der Untersuchung von Citrat-Thrombin in der Ultrazentrifuge Fraktionen mit einem Molekulargewicht von 5,000, 15,000 und 45,000 gefunden. Nach neuesten Untersuchungen von GLADNER, LAKI UND STOLMAN³⁹ soll das Molekulargewicht des Thrombins nur 14,000 betragen, was auch seine schwache immunologische Präzipitierbarkeit erklären würde. Es kann kein Zweifel daran bestehen, dass für die Citrataktivierung von Prothrombin der "Dissociationsphase" die grösste Bedeutung, etwa im Sinne einer "Enthemmung" des Prothrombins, bis zum Zeitpunkt der eigentlichen Thrombinbildung zukommt. Es war daher naheliegend zu versuchen, durch vorhergehende Abspaltung von Kohlenhydrat ein im Citrat schneller aktivierbares Prothrombin zu gewinnen. Hierzu wurde Prothrombin mit Neuraminidase (Receptor Destroying Enzyme aus Cholerakulturfiltrat)⁴⁰ behandelt und dialysiert, so dass der Gehalt des Prothrombins an Acetylneuraminsäure mit 1.4% nur noch etwa 1/3 der ursprünglichen Menge (4.1%) betrug.

Wie aus der in Fig. 6 angeführten Reaktionskurve hervorgeht, fehlt bei der Citrataktivierung des neuraminidasevorbehandelten Prothrombins die "Dissociationsphase" praktisch völlig, so dass bereits nach 4-6 Stunden eine vollständige Überführung des Prothrombins in Thrombin stattfindet, was bei dem nicht vorbehandelten Präparat erst nach etwa 30 Stunden der Fall ist. Die immunoelektrophoretische Kontrolle lässt ebenfalls einen direkten Übergang des Neuraminidase-Prothrombins, das eine sehr viel langsamere elektrophoretische Beweglichkeit als das Ausgangspräparat aufweist, in die Aktivierungsphase erkennen.

ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Die Untersuchungen haben ergeben, dass hochgereinigte Prothrombin- und Thrombinpräparate, so wie es bereits für eine Anzahl anderer Fermente nachgewiesen wurde, artspezifische antigene Eigenschaften besitzen. Diese sind bei Prothrombin stärker ausgeprägt als bei dem niedermolekularen Thrombin. Es muss offen bleiben, ob die Ursache der Antithrombinwirkung des Antiprothrombinserums durch eine Kreuzreaktion dem Prothrombinantikörper selbst oder durch direkte Anti-Thrombinantikörper bedingt ist. Letztere könnten sich *in vivo* durch die Umwandlung der bei der Immunisierung injizierten Prothrombinmengen in Thrombin gebildet haben.

Von besonderem Interesse ist der Befund, dass das Antiprothrombinserum in hohem Masse befähigt ist, Faktor VII, Faktor IX und Faktor XI zu neutralisieren. Demgegenüber tritt die Anti-Faktor V- und Anti-Faktor VIII-Wirkung des Serums weit zurück. Da die Untersuchungen in der Tiselius-Elektrophorese und Ultrazentrifuge zeigen, dass es sich bei dem nach SEEGERs hergestellten Rinderprothrombin keineswegs um ein 100% reines Protein handelt, muss die Möglichkeit diskutiert werden, ob das Präparat von vornherein mit anderen Gerinnungsfaktoren verunreinigt ist und dadurch Antikörper gegen diese Faktoren entstanden sind. Geringe Faktor V-, VII-, IX- und XI-Aktivitäten lassen sich tatsächlich auch regelmässig in den hochgereinigten Prothrombinen nachweisen, wobei die Verunreinigung durch Faktor V im Vordergrund steht.

Obwohl wir aufgrund des vorher Gesagten nicht die Bildung von Antikörpern gegen Spurenverunreinigungen des Prothrombins an anderen Gerinnungsfaktoren, vornehmlich Faktor VII, IX und XI, ausschliessen können, neigen wir bei Berück-

sichtigung neuester Erkenntnisse auf diesem Gebiet der Blutgerinnungsforschung doch eher zu der Annahme, dass der spezifische Prothrombinantikörper selbst imstande ist, die Gerinnungsfaktoren VII, IX und XI zu neutralisieren. Wegen ihrer dem Prothrombin sehr ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften hat man für diese drei Gerinnungsfaktoren bereits immer eine sehr enge Beziehung zum Prothrombin angenommen.

In neuerer Zeit haben SEEGERs und Mitarbeiter diese Annahme gestützt, indem sie nachwiesen, dass unter bestimmten Bedingungen aus dem Prothrombin selbst die Acceleratoren VII und IX, die sie mit Autoprothrombin I und II bezeichneten, hervorgehen⁴¹⁻⁴⁹. Untersuchungen von LASCH UND ROKA^{51, 52}, die inzwischen von ALKJAERSIG UND SEEGERs⁵⁰ bestätigt werden konnten, haben darüberhinaus ergeben, dass unter der Einwirkung von Lebermitochondrien auf Faktor VII bzw. Autoprothrombin *in vitro* Prothrombin entsteht. Dieser Prozess soll nach LASCH und Mitarb.^{53, 54} auch *in vivo* ablaufen, wobei eine "latente Gerinnung" vorausgesetzt wird, die im Blut eine ständige Umwandlung von Prothrombin in Thrombin und Faktor VII bewirkt. Letzterer soll in der Leber wieder aufgenommen und zu Prothrombin resynthetisiert werden. Wir glauben, dass unsere immunologischen Befunde eine weitere Stütze für diese bisher nur teilweise bewiesene Theorie sein können. Insbesondere bestätigen die Ergebnisse der immunoelektrophoretischen Kontrollversuche der Citrataktivierung von Prothrombin die Befunde von SEEGERs, wonach bei der Citratumwandlung verschiedene Intermediärprodukte, von ihm "Prothrombin-Derivate" genannt, mit neuen Eigenschaften entstehen. Zu diesen zählen nach SEEGERs, wie erwähnt, Autoprothrombin I (Faktor VII) und Autoprothrombin II (Faktor IX). Aufgrund eigener Untersuchungen des Stuartfaktors gelangten wir bereits früher^{25, 26} zu der Auffassung, dass auch dieser Faktor ein Autoprothrombin im Sinne von SEEGERs ist.

Der Befund, dass ein mit Neuraminidase vorbehandeltes Prothrombin eine besonders schnelle Citratumwandlung erfährt, verdient schliesslich noch deshalb besondere Beachtung, weil bei Abschluss dieser Arbeit eine Mitteilung von NILSSON UND YAMASHINA⁵⁵ erschien, in der die Autoren über einen gerinnungshemmenden Einfluss des sehr neuraminsäurereichen niedermolekularen α_1 -Säureproteins^{56, 57} berichten. Obwohl es, wie wir bestätigen können⁵⁸, nicht gelingt, die Umwandlung von Prothrombin in Citrat durch Zusatz des α_1 -Glykoproteins zu hemmen, weisen NILSSON UND YAMASHINA für andere Gerinnungssysteme eine kompetitive Hemmung der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin durch das sehr kohlenhydratreiche α_1 -Globulin nach. Man wird also künftig dem proteingebundenen Kohlenhydrat im Zusammenhang mit der Blutgerinnungsforschung mehr Aufmerksamkeit schenken müssen, wobei immunologische Nachweismethoden von Nutzen sein können.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Immunisierung eines Pferdes mit hochgereinigtem Prothrombin vom Rind (SEEGERs) führt zu präzipitierenden, artspezifischen Antikörpern gegen Prothrombin und Thrombin (in vermindertem Ausmasse), was durch quantitative (Immunpräzipitation nach HEIDELBERGER) und qualitative (Immunoelektrophorese nach GRABAR, SCHEIDEGGER) Immunreaktionen belegt wird. Das Antiprothrombinserum neutralisiert in relativ hohem Masse die Aktivität der Gerinnungsfaktoren VII (Convertin), IX (Christmasfaktor) und XI (Stuartfaktor). Es wird diskutiert, ob dies auf eine

primäre Verunreinigung des immunoelektrophoretisch nicht einheitlichen Prothrombins durch Spuren dieser Gerinnungsfaktoren zurückzuführen ist oder ob der spezifische Prothrombinantikörper mit diesen, dem Prothrombin chemisch-physikalisch ähnlichen Gerinnungsfaktoren direkt reagiert. Es werden die immunchemischen Veränderungen, die bei der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin in 25%iger Natriumcitratlösung auftreten, studiert und es wird gezeigt, dass ein mit Neuraminidase vorbehandeltes Prothrombin sehr viel schneller in Thrombin überführt werden kann als unvorbehandeltes Prothrombin.

SUMMARY

IMMUNOCHEMICAL EXPERIMENTS WITH PROTHROMBIN AND THROMBIN

The immunisation of a horse with highly purified prothrombin derived from cattle (SEEGERS) yielded precipitating, species-specific prothrombin and – to a lesser extent – thrombin antibodies. Quantitative and qualitative evidence of the substance were provided by immunoprecipitation (method of HEIDELBERGER) and immunoelectrophoresis (according to GRABAR AND SCHEIDEGGER) respectively. Prothrombin antiserum is a comparatively strong neutraliser of the coagulation factors VII (Convertin), IX (Christmas factor) and XI (Stuart factor). The problem is discussed, whether this is due primary to contamination by trace amounts of these coagulation factors in the immunoelectrophoretically inhomogeneous prothrombin, or whether the species-specific prothrombin antibody reacts directly with the coagulation factors which are physico-chemically similar to prothrombin. Immunochemical changes occurring during the mutation of prothrombin into thrombin in 25% sodium citrate solution were studied, and it was shown that in prothrombin pre-treated with neuraminidase, the rate of mutation is much faster than in un-pretreated prothrombin.

LITERATUR

- ¹ E. DEUTSCH, *Hemmkörperhämphilie*, Springer-Verlag, Wien, 1950.
- ² E. DEUTSCH, *Blutgerinnungsfaktoren*, Deuticke, Wien, 1955, S. 47.
- ³ W. REMDE, *Wiss. Z. Friedrich Schiller-Univ. Jena, Math. Naturwiss. Reihe*, 4 (1954/55) 530.
- ⁴ A. WINDORFER, H. E. SCHULTZE UND G. SCHWICK, *Blut*, 2 (1956) 217.
- ⁵ M. H. HÖRDER, *Acta Haematol.*, 13 (1955) 235.
- ⁶ M. H. HÖRDER UND G. SOKAL, *Acta Haematol.*, 14 (1955) 65.
- ⁷ C. S. KINGSLEY, *Nature*, 173 (1954) 723.
- ⁸ J. JÜRGENS, *Klin. Wochschr.*, 33 (1955) 143.
- ⁹ J. JÜRGENS, *Acta Haematol.*, 14 (1955) 57.
- ¹⁰ M. D. RICHARDS UND T. H. SPAET, *Blood*, 11 (1956) 473.
- ¹¹ P. HALICK UND W. H. SEEGERS, *Am. J. Physiol.* 187 (1956) 103.
- ¹² J. OUDIN, in A. C. CORCORAN *Methods in Medical Research*, Vol. 5, Year Book Publ. Co., Chicago, 1952, S. 335.
- ¹³ W. H. SEEGERS, E. C. LOOMIS AND J. M. VANDENBELT, *Arch. Biochem.*, 6 (1945) 85.
- ¹⁴ W. H. SEEGERS, *Record Chem. Progr. Kresge-Hooker Sci. Lib.*, (1953) 143.
- ¹⁵ H. E. SCHULTZE UND G. SCHWICK, *Z. physiol. Chem.* 289 (1951) 26.
- ¹⁶ H. E. SCHULTZE UND G. SCHWICK, *Z. exptl. Med.*, 118 (1952) 453.
- ¹⁷ W. H. SEEGERS, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 72 (1949) 677.
- ¹⁸ E. BIDWELL, *Brit. J. Haematol.*, 1 (1955) 386.
- ¹⁹ M. HEIDELBERGER UND F. E. KENDALL, in E. E. KABAT UND M. M. MAYER *Experimental Immunchemistry*, C. Thomas, Publ., Springfield Ill., 1948.
- ²⁰ J. J. SCHEIDEGGER, *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7 (1955) 103.
- ²¹ H. E. SCHULTZE UND G. SCHWICK, *Medizinische*, 42/43 (1953) 1354.
- ²² G. SCHWICK, in *The Protides of Biological Fluids* (Proceedings 3rd Colloquium, Bruges, 1955), S. 89.

- ²³ R. BIGGS, A. S. DOUGLAS, R. G. MCFARLANE, J. V. DACIE, W. R. PITNEY, C. MERSKEY UND J. R. O'BRIEN, *Brit. Med. J.* 4799 (1952) 1378.
- ²⁴ G. SCHWICK, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 171.
- ²⁵ H. E. SCHULTZE, G. SCHWICK, F. SACHS UND G. IHRINGER, *Medizinische*, 15 (1956) 578.
- ²⁶ H. E. SCHULTZE UND G. SCHWICK, *Blut*, 3 (1957) 233.
- ²⁷ M. SØRENSEN UND G. HAUGAARD, *Biochem. Z.*, 260 (1933) 247.
- ²⁸ P. BÖHM, ST. DAUBER UND L. BAUMEISTER, *Klin. Wochschr.*, (1954) 289.
- ²⁹ B. CINADER, *Ann. Rev. Microbiol.*, 11 (1957) 371.
- ³⁰ P. H. MAURER, *J. Immunol.*, 72 (1954) 119.
- ³¹ G. H. F. NUTTALL, *Blood Immunity and Blood Relationship*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1904, p. 444.
- ³² H. G. WELLS, *The Chemical Aspects of Immunity*, 1929, S. 286.
- ³³ L. LORAND, N. ALKJAERSIG UND W. H. SEEGER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 45 (1953) 312.
- ³⁴ K. D. MILLER UND W. H. SEEGER, *Arch. Biochem. Biophys.* 60 (1956) 398.
- ³⁵ H. E. SCHULTZE UND G. SCHWICK, *Behringwerk-Mitteilungen*, 33 (1958) 1.
- ³⁶ W. H. SEEGER, T. ABE UND R. L. FENICHEL, *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 34 (1956) 270.
- ³⁷ W. H. SEEGER, R. J. MCCLAUGHRY UND E. B. ANDREWS, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 75 (1950) 714.
- ³⁸ D. F. WAUGH, 3. *Ann. Sympos. on Blood*, 1954, Detroit, USA.
- ³⁹ J. A. GLADNER, K. LAKI UND F. STOLMAN, *Nature*, 1958 (im Druck) zit. bei: R. K. BROWN, *Klin. Wochschr.*, 36 (1958) 1.
- ⁴⁰ F. M. BURNET, J. F. MCCREA UND J. D. STONE, *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 27 (1946) 228.
- ⁴¹ N. ALKJAERSIG, T. ABE, SH. A. JOHNSON UND W. H. SEEGER, *Am. J. Physiol.*, 182 (1955) 443.
- ⁴² J. A. PENNER UND W. H. SEEGER, *Am. J. Physiol.*, 186 (1956) 343.
- ⁴³ J. A. PENNER, F. DUCKERT, SH. A. JOHNSON UND W. H. SEEGER, *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 34 (1956) 1199.
- ⁴⁴ W. H. SEEGER, N. ALKJAERSIG UND SH. A. JOHNSON, *Am. J. Physiol.*, 181 (1955) 589.
- ⁴⁵ W. H. SEEGER, *Soc. Biol. Chem. India, Silver Jubilee Souvenir* (1955) 88.
- ⁴⁶ W. H. SEEGER UND SH. A. JOHNSON, *Am. J. Physiol.*, 184 (1956) 259.
- ⁴⁷ W. H. SEEGER UND N. ALKJAERSIG, *Arch. Biochem. Biophys.*, 61 (1956) 1.
- ⁴⁸ W. H. SEEGER, SH. A. JOHNSON UND J. A. PENNER, *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 34 (1956) 887.
- ⁴⁹ H. H. SESSNER UND L. RÓKA, Unveröffentl. Ergebnisse.
- ⁵⁰ N. ALKJAERSIG UND W. H. SEEGER, *Am. J. Physiol.*, 183 (1955) 111.
- ⁵¹ H. G. LASCH UND L. RÓKA, *Z. Physiol. Chem.*, 294 (1953) 30.
- ⁵² H. G. LASCH UND L. RÓKA, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 460.
- ⁵³ H. G. LASCH, K. MECHELKE UND E. NUSSE, *Deut. Arch. klin. Med.*, 204 (1957) 1.
- ⁵⁴ H. G. LASCH, K. MECHELKE, E. NUSSE UND H. H. SESSNER, *Z. exptl. Med.*, 129 (1958) 484.
- ⁵⁵ J. M. NILSSON UND J. YAMASHINA, *Nature*, 181 (1958) 711.
- ⁵⁶ K. J. SCHMID, *J. Chem. Soc. Japan*, 75 (1953) 60.
- ⁵⁷ J. YAMASHINA, *Acta Chem. Scand.*, 10 (1956) 1666.
- ⁵⁸ Eigene unveröffentliche Befunde.

ÜBER NATÜRLICHE HEMMSTOFFE DES INTRINSIC FACTOR

H. C. HEINRICH UND J. KÜHNAU

*Physiologisch-chemisches Universitätsinstitut, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf,
Hamburg (Deutschland)*

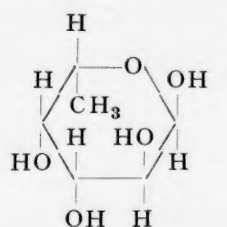
In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass beim Schwein die für die Bedarfsdeckung voll ausreichende *Resorption* oraler Gaben von *Radio-Vitamin B₁₂* durch Präparate von *Intrinsic factor* (IF), die aus der *Pylorusmucosa* vom Schwein gewonnen waren, über die Norm hinaus verstärkt wird. Wurde das gleiche IF-Präparat unter Umgehung des Magens und der Duodenalsonde zusammen mit Radio-B₁₂ verabfolgt, so blieb nunmehr der Aktivierungseffekt aus. Diese Beobachtung sowie der Befund, dass die B₁₂-Resorption – gemessen mittels Radio-B₁₂ im Urin-Exkretions-Test – beim gastrektomierten Schwein normal war, wiesen darauf hin, dass beim Schwein der sogenannte IF nur dann die B₁₂-Resorption fördert, wenn die Magenfunktion intakt ist, nicht aber beim gastrektomierten Tier oder bei Verabfolgung mit der Duodenalsonde. Eine IF-Produktion im Duodenum konnte dadurch ausgeschlossen werden, dass lyophilisiertes Duodenum pylorektomierter Schweine jede IF-Aktivität vermissen liess.

Präparate von Schweine-Magenschleimhaut aus der Fundus- und Kardiagegend erwiesen sich nicht nur als frei von IF, sondern entfalteten darüber hinaus eine erhebliche Inhibitorwirkung gegenüber der B₁₂-Resorption beim Menschen und beim intakten und gastrektomierten Schwein. Die Inhibitorwirkung wird durch gleichzeitige Verabfolgung etwa gleich grosser Dosen wirksamer IF-Präparate nicht aufgehoben. Der Inhibitor weist also eine hohe Affinität zum Vitamin B₁₂ auf. Die Existenz von IF-Hemmstoffen in Fundus und Kardial des Schweinemagens und die Wirkungslosigkeit des IF nach Ausschaltung des Magens lassen die Möglichkeit zu, dass der IF nicht selbst die Resorption des Vitamin B₁₂ fördert, sondern die Aufgabe hat, als "Anti-inhibitor" die Hemmwirkung des Fundusprinzips zu neutralisieren.

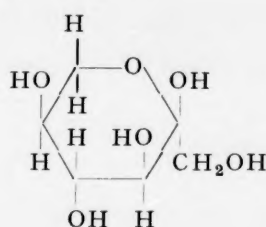
Untersuchungen über die chemische Natur des Hemmstoffes und seinen Wirkungsmechanismus ergaben, dass die Hemmwirkung durch proteolytische Wirkung und durch Erhitzen auf 100° nicht beeinträchtigt wird. Unter der Voraussetzung, dass der Hemmstoff dem IF chemisch verwandt, also ebenfalls ein Glykoprotein ist, würde seine Resistenz gegen Hitze und Proteolyse bedeuten, dass der Hemmstoffeffekt an die Kohlenhydratgruppierung geknüpft ist. Unter diesem Gesichtspunkt erwies sich der Befund als bedeutsam, dass das Monosaccharid *L-Sorbose* ebenfalls eine Hemmwirkung gegenüber der B₁₂-Resorption beim Menschen und beim Schwein entfaltet. Da die *L-Sorbose* ein Strukturanalogon des im Molekül des IF vorkommenden Zuckers *L-Fucose* darstellt, besteht Grund zu der Annahme, dass die *L-Sorbose* durch kompetitive Verdrängung des *L-Fucose*anteils des IF-Moleküls hemmend auf die B₁₂-Resorption wirkt und dass der Fucoseanteil des IF-Moleküls die Bindung des IF an das Vitamin B₁₂ vermittelt. Es wird angenommen, dass gewisse Monosaccharide mit den IF-

wirksamen Glykoproteiden um eine spezifische Gruppierung in der Struktur des B_{12} -Moleküls konkurrieren und dadurch eine Hemmwirkung entfalten können.

Weitere Versuche sollen die Strukturspezifität dieses Vorganges klären.



α -L-Fucopyranose



α -L-Sorbopyranose

ZUSAMMENFASSUNG

Werden vollwirksame Präparate von Intrinsic Factor beim Schwein intraduodenal oder nach Gastrektomie verabfolgt, so wirken sie nicht mehr fördernd auf die B_{12} -Resorption. Ihr physiologischer Effekt beruht also wahrscheinlich auf der Ausschaltung eines im Magenfundus produzierten Hemmstoffes der B_{12} -Resorption. Hochwirksame Präparate dieses Hemmstoffes konnten aus Fundusschleimhaut gewonnen werden. Auch L-Sorbose wirkt hemmend auf die Resorption von B_{12} -Vitamin, indem dieser Zucker einen stabilen, unresorbierbaren B_{12} -Komplex bildet. Normalerweise wird B_{12} im Darm offenbar an den L-Fucose-Anteil des Intrinsic Factor gebunden. Es wird angenommen, dass die der Fucose strukturanaloge Sorbose diesen Bindungsprozess verhindert.

SUMMARY

NATURAL INHIBITORS OF THE INTRINSIC FACTOR

Fully active preparations of the Intrinsic Factor (IF) given to pigs intraduodenally or after gastrectomy no longer favoured B_{12} resorption. Their physiological action can thus be attributed to the elimination of a B_{12} -resorption inhibitor produced in the fundus. Highly active preparations of this inhibitor could be derived from the mucosa of the fundus. L-Sorbose is another inhibitor of vitamin- B_{12} resorption, since it forms a stable, unresorbable B_{12} -complex. Normally, B_{12} is clearly bound in the intestine to the L-fucose fraction of the IF. It is assumed that this binding process is blocked by sorbose, which is a structural analogue of fucose.

COMPARATIVE STUDIES OF THE PROTEIN FRACTIONS FROM HUMAN GASTROINTESTINAL JUICES WITH PAPER ELECTROPHORESIS COMBINED WITH VARIOUS DETECTION METHODS

J. C. M. VERSCHURE

with the technical assistance of

CARLA W. VAN DER SCHAAR AND GRETA HADDERS

Clinical-Chemical Laboratory of the Medical Clinics, State University, Utrecht (The Netherlands)

In recent years, electrophoretical studies of proteins in gastrointestinal juices have attracted increasing interest. Saliva was studied, mainly in relation to dental problems¹⁻⁷; gastric juice in relation to the intrinsic factor⁸⁻¹⁰ or physiological and pathological problems¹²⁻²¹; bile^{24, 25}, especially in relation to bile stone formation^{22, 23} and the pancreatic juice of animals²⁶⁻³⁰ for its protein composition and enzyme distribution. Separation of the fractions by means of paper electrophoresis was described in the papers^{1, 2, 9, 12, 13, 15, 17-20, 22-25, 29, 30}. Technical difficulties proved to be of major importance, therefore, the results of many investigations were incomparable, or contradictory as far as numbers, significance and the quantitative ratio of the protein fractions were concerned. Thus it is hardly possible as yet to describe the "normal pictures". With few exceptions (*e.g.*²¹), changes under pathological conditions have received little attention. Comparative studies on human material are practically lacking.

This paper deals with the results of more than 5000 paper electrophoresis diagrams of human gastrointestinal juices. We tried to find the optimal conditions for the separation of the fractions. A number of detection methods were developed and compared with various existing techniques. The discussion of the results will be restricted mainly to the qualitative aspects of the diagrams.

MATERIAL AND METHODS

The choice of methods was restricted to such simple procedures as could eventually be used for clinical routine purposes.

Collection of samples

Fresh samples, obtained at room temperature, were compared with those collected in ice. We collected whole saliva under various conditions; gastric juice with and without stimulation, carefully avoiding contamination with saliva; bile from postoperative fistulas only, from the gall-bladder only by puncture of the gall-bladder during surgery; pancreatic juice from postoperative fistulas only, and from extracts of fresh pancreas. The material was always filtered or centrifuged.

Concentration

This was done in small cellophane tubing (Dialysier Schlauch, Kalle & Co, Wiesbaden-Biebrich), against 25% solutions of carboxymethyl cellulose or polyvinyl pyr-

rolidone, in the refrigerator at 4°, mostly during 48 to 72 h. A number of samples were freeze-dried and before use, they were made up to solutions of suitable concentration. When labelled with radio iodine, concentration was unnecessary, and the juices could be used directly or after dilution.

Electrophoresis

This was performed in horizontal strip cabinets, carrying 10 strips pro run. Strips of 24 × 4 cm were used at 180 V, resulting in a potential gradient of about 7.5 V/cm. The time for electrophoresis was 2 to 4 h. This proved to be sufficient in practically all cases.

Buffer solutions used were: barbital buffer pH 8.6 and ionic strength 0.06, or borate buffer pH 9.0 and ionic strength 0.12 as suggested by GLASS *et al.*²¹. Filterpaper: Whatman No. 1 and 3, and Nagell & Macherey No. F 214 papers, the latter of which had relatively large pores.

Staining procedures

Proteins were stained either with azocarmine or with amido black. The latter was preferred, giving more distinct patterns.

Carbohydrate stain. The periodic acid stain of KOÏW AND GRÖNWALL³¹ was used, as modified by LAURELL AND SKOOG³².

Lipids and lipoproteins were stained with the common Sudan Black B stain of Swahn. For *bilirubin* a spray with diazo reagent was developed²².

For *bile acids* we developed a stain with vanillin-phosphoric acid²².

Amylase may be detected directly on the paper strips in the following way. After completing the run, the wet filterpaper strips are placed horizontally and allowed to dry at 37°. They are then sprayed lightly and evenly with an amylum solution containing 2 mg/ml, kept for about 10 min at 37° and subsequently sprayed with an iodine solution of 0.05 N. The strip stains dark blueish. A white band marks the place where the amylum was digested by amylase. The width of the band depends partly upon the time given for digestion. By shortening this time if the band is too broad, a narrow band may be obtained, allowing accurate location of amylase in relation to other constituents. After marking the place of the amylase band with a pencil, the diagram may be used in the ordinary way for protein stain. The method is sensitive. Application of 3 U amylase (Wohlgemuth) to the filterpaper suffices for a positive result (Fig. 3d).

Lipase activity may be detected in a way, similar to amylase. The wet paper strips are dried horizontally at room temperature. They are then dipped in a 0.1% solution of olive oil in petroleum ether (b.p. 60–80°) and dried at room temperature. After allowing about 30 min for digestion, the diagrams are stained with Swahn's lipid stain. A light band in the blueish strip marks the place of lipase activity (Fig. 3e). The limit of sensitivity lays at 0.45 U lipase on the strip.

Proteolytic activity. A suitable method for direct detection on the strip could not be developed. Various procedures were not sufficiently sensitive.

Labelling of proteins with ¹³¹I

Active iodine is prepared by oxidation of iodide with iodate, using the procedure of VEALL *et al.*³³ as modified by FOSS³⁴ for use in cerebrospinal fluid.

Reagents. No. 1: 1% human albumin in barbital or borate buffer. No. 2: Carrier-free Na^{131}I , obtained from "Isotopen Lab. Philips-Roxane" Amsterdam. No. 3: 1% KI solution in aqua dest. No. 4: 1% KIO_3 solution in aq. dest. No. 5: 0.2 N HCl. No. 6: 9% NaCl solution in aq. dest. No. 7: 0.1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution.

Directly before labelling proteins, a solution with free ^{131}I is prepared by mixing 0.7 ml No. 2, 0.1 ml No. 6, 0.01 ml No. 3 and 0.025 ml No. 4 whereafter 0.05 ml reagent No. 5 is added and after mixing, the solution is allowed to stand for 5 min. The protein solutions to be labelled are brought to a pH value between 8 and 10. The best results were obtained by titrating with 0.1 N NaOH to pH 8.5. This step is essential. 0.1 ml of the protein solution is then mixed with 0.1 ml of the freshly prepared ^{131}I solution and kept at room temperature for 5 min. The excess of ^{131}I is bound by adding 0.05 ml reagent No. 7 and mixing. From this final solution 0.01 to 0.04 ml are applied on the filter paper strips, the volume depending mainly upon the protein concentration of the solution to be analysed. From various methods of iodination³⁵, the one described here gave the best results with gastrointestinal juices. The results were well reproducible.

Variation of virtually every experimental condition finally led to 4 different methods, the results of which will be shown.

Method 1. Routine method as used for serum electrophoresis, adapted for gastrointestinal juices. The juices had to be strongly concentrated (often 50 to 100 times). Whatman No. 1 or 3 was used as filterpaper. Electrophoresis was performed in barbital buffer as described. The strips were stained with amido black or azocarmine.

Method 2. The procedure of GLASS *et al.*²¹ was followed exactly. However, we used cabinets for horizontal strips and for practical reasons the time of electrophoresis was 4 h.

Method 3. The juices were used directly without concentration. They were labelled with radio-iodine as freshly as possible. With this method diagrams could be made with only 3–5 μg of protein. Electrophoresis was carried out on Whatmann No. 1 filterpaper, the paper was dipped in buffer solution with 1% human albumin in order to avoid adsorption of labelled proteins on the filter paper. Barbital buffer of pH 8.6 was used. The air-dried diagrams were used to make radio autograms.

Method 4. The juice was unconcentrated but otherwise the conditions were those given by GLASS *et al.*²¹ (preliminary dialysis, buffer of pH 9.0, etc.). The proteins were labelled with radio-iodine as described above.

RESULTS AND DISCUSSION

Saliva

The diagrams obtained with whole saliva from normal adults are shown in Fig. 1.

With Method 1, poor diagrams were obtained. The material at the base line is mainly visible mucus. Two or three fractions are noted. Method 2 (GLASS) gave a much better separation and five fractions are visible. Method 3, using fresh, unconcentrated saliva, labelled with radio-iodine, gave results superior to those obtained with the other methods. Nine fractions are generally found, besides smaller discontinuities in the densitometric readings, that might originate from subfractions. The 3 fractions under 2 (Fig. 1c) are rather variable. The fractions 1, 3, 4 and 5 are much more stable. Fraction 6 is missing in various samples. Some of the fractions under 2,

and also fraction 6 are lost after preliminary dialysis of the saliva sample. They might be dialysable polypeptides. This fact, together with denaturation at higher pH values may explain the poor results with Method 4. Method 3 was used exclusively in our further studies.

Technical notes. No differences could be found between samples kept in ice and those kept at room temperature, even for 24 h. Frozen samples at pH 8.5 could be stored at least a fortnight without detectable deterioration. For Methods 1 and 2, freeze-dried samples gave better results than those concentrated with the aid of strong colloid solutions. Filterpaper having larger pores gave slightly better results than Whatmann No. 1, but the loose structure presented more difficulty at staining.

No quantitative conclusions may be drawn from the diagrams of Fig. 1c, because the density of the bands not only depends upon the protein concentration but also upon the tyrosine (and histidine) content of the protein fractions, because iodination takes place mainly at these sites. The dotting at the base line is mainly due to dust particles, loaded with radio active iodide and difficult to avoid.

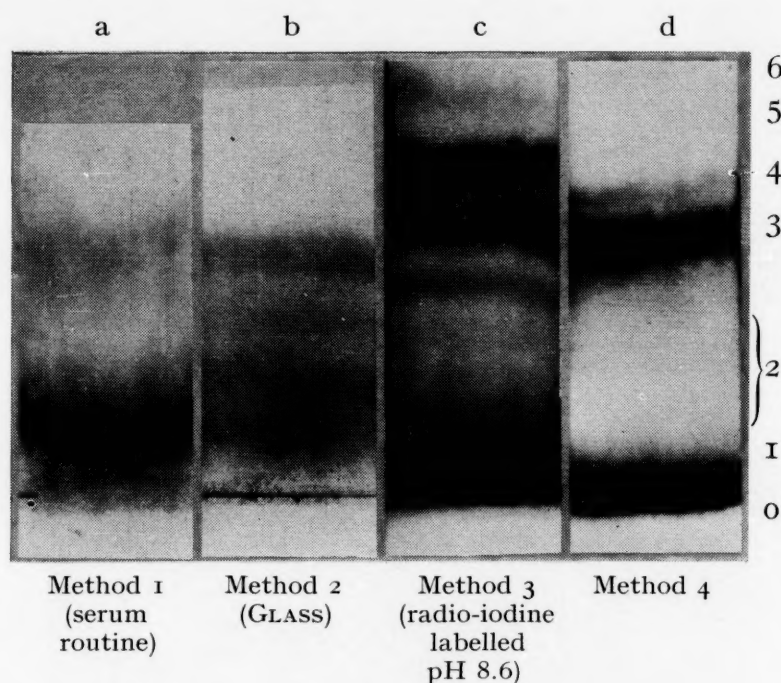


Fig. 1. Saliva.

With *carbohydrate stain*, 3 fractions are revealed. The one at the base line represents the visible mucus; the second one coincides with the place where the amylase activity is concentrated (Fig. 3d).

Finally it was noted that increasing concentration of the saliva sample gave a decrease in the number of bands. At high concentration, only two fractions were seen. This suggests the association of the protein molecules.

Physiological and pathological data. Although absolute quantities of the various components could not be studied, changes in the concentrations under various conditions may be followed if the technique is standardised. The relation between the various constituents may be measured as *relative densities* of the bands. These may be translated into relative protein concentrations as soon as the binding capacity

for ^{131}I of each component is known. With method 3, in this way 15 samples of whole saliva of normal adults were measured. The samples were taken about 2 h after breakfast. They are compared with the results of 4 samples, collected in the early morning after 10 h fasting. Another 6 samples were studied, that were obtained after stimulation (chewing on some quartz sand). The results are given in Table I.

TABLE I

Fraction No.	1	2	3	4	5	
Mean of 15 "fasting" saliva samples	35	21	11	25	8	rel. %
Standard deviation	5.3	3.2	2.1	5.1	4.0	
Early morning saliva samples. Mean of 4	19	26	11	35	10	rel. %
"Rinsing" saliva, mean of 6 samples	38	20	11	23	8	rel. %

Fraction 0 (Fig. 1c) was disregarded in the measurements owing to the disturbances at the base line. In some instances (5 times in 25 samples) 2 of the fractions were not adequately separated and were taken together. From Table I it is clear that the protein fractions of saliva are not as stable as those of the blood serum. Standard deviations are much greater than those found with serum proteins in comparable solution, by the same method. Although the numbers are still small, the results strongly suggest that "fasting saliva" during the day has a constitution that closely

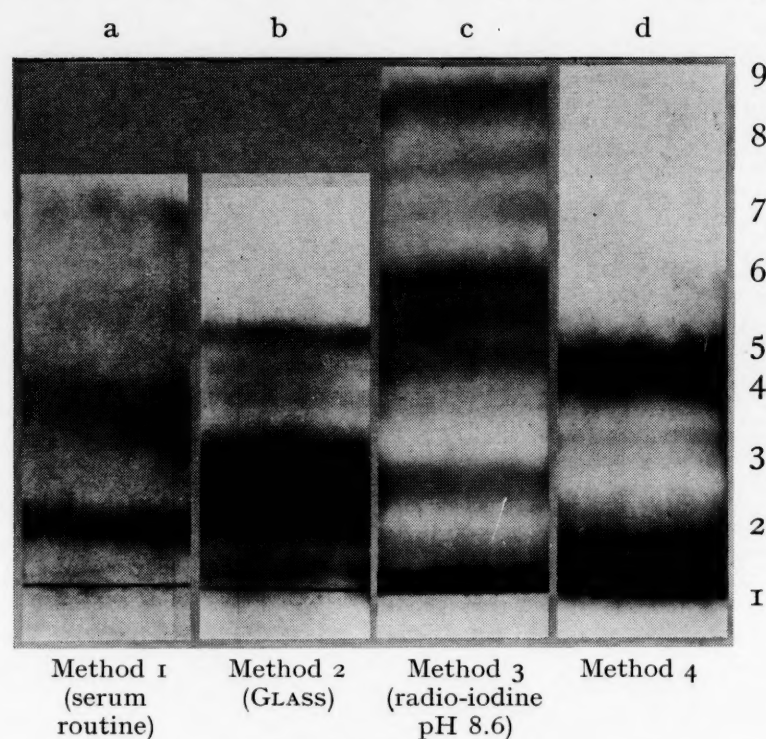


Fig. 2. Gastric juice.

resembles that of the "rinsing" saliva and differs significantly from the "resting" saliva taken early in the morning before breakfast, and before talking or other activities. This is especially clear for the fractions 1 and 4.

The study of the *pathology* of saliva proteins is at an elementary stage. We noted changes in the proportion of the 5 main fractions, the appearance of extra bands and of split bands in cases of stomatitis, acute pancreatitis, hepatitis, obstructive jaundice

and pernicious anaemia. Much work has yet to be done before definite conclusions may be drawn.

Gastric juice

The data in this paper are restricted to normal fasting gastric juices. Diagrams, obtained with the 4 methods are given in Fig. 2.

Method I, with strongly concentrated gastric juice, gives blurred broad bands, showing 3 to 5 fractions. In our hands, Method 2 did not give as good results as those obtained by GLASS himself, although the diagrams were much better than those of Method 1. Association of proteins at higher concentration, as had already been noticed in saliva, was obvious in both Method 1 and 2. Method 3 again gave the best separation and was less time consuming. Special care must be taken to bring the juice at pH 8.5 directly before iodination. This must be done with 0.1 N NaOH. 8 to 11 fractions can be distinguished in most of the diagrams. A very small portion of the material moves towards the anod, as has already been noted by GLASS. This quantity is too small to be seen in the reproduction of the diagram in Fig. 2 c. Method 4 gave disappointing results and was abandoned.

Technical notes. Contamination of the gastric juice with saliva interferes greatly with the results and had to be avoided by draining the saliva, e.g. by dental tampons.

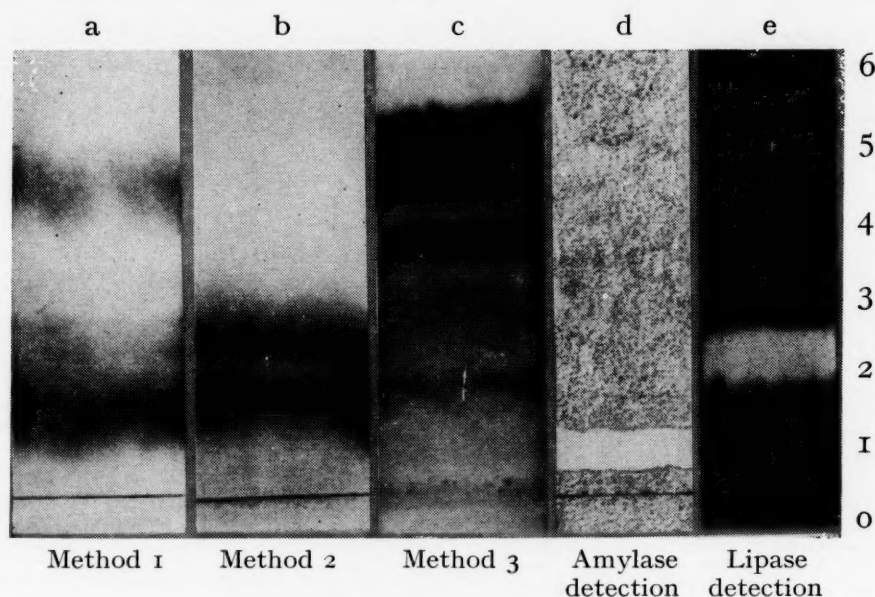


Fig. 3. Pancreatic juice.

The most important observation seems to be that concentration of the gastric juice results in a decrease of the number of bands that may be found, which intimates the association of proteins. This drawback is avoided by Method 3, as the labelling of proteins with radio-iodine allows very small quantities of proteins to be separated. Thus, a protein concentration of about 25 mg% is sufficient.

With the carbohydrate stain, 2 to 3 fractions are found, one at the base line with the appearance of coagulated mucus and one at the place of fraction 2 (Fig. 2c). Often a third fraction is present with somewhat higher mobility.

The lipid stain gives negative results. Peptic activity was found to be strongest in the faster moving fractions.

Bile

The diagrams of bile samples differ essentially from those obtained with saliva and gastric or pancreatic juice. The results were reported in separate communications^{22, 23}.

Pancreatic juice

A number of samples of human pancreatic juice from two patients with pancreas fistulas were studied. Comparative results with various methods are given in Fig. 3.

With Method 1, in unconcentrated samples 5 very faint bands are barely visible. Concentration up to 2% proteins shows diagrams with 3 bands. Stronger concentrations, up to 10 % or even 25%, give diagrams with only 2 strongly stained broad bands, once more giving evidence of protein association. Method 2 lacks the ability of adequately fractionating, apparently as a result of the above mentioned protein association. With Method 3, in strongly diluted solution (the juice was diluted with 1 or 2 vol. water), good resolution is found and 7 fractions are seen. Diagrams 3d and 3e show the results of the detection methods for amylase and lipase. The main proteolytic activity is found before the lipase activity. The mucus component at the base line is practically missing in the pancreatic juice. The carbohydrate stain is much weaker than in the saliva and gastric juice diagrams. Only in concentrates of 25% total solutes is a faint positive stain obtained. The lipid stain is negative.

Physiological data. The dry weight of 23 portions of human pancreatic fistula juice varied between 0.75 and 1.57 g% with a mean value of 1.30 g%. No constant difference between day and night portions was found. However, amylase production during the day was somewhat higher than during the night. In 23 portions it was found to lie between 3072 and 12288 U (WOHLGEMUTH). The lipase content was very inconstant, varying between 0.9 and 28 U.

The total protein contents in 19 portions varied between 35 and 220 mg%, with a mean value of 130 mg% (by nephelometry and the micro-Kjeldahl method).

SUMMARY

Conditions were studied for the optimal routine separation of the proteins in saliva, gastric juice, bile and pancreatic juice by paper electrophoresis. From an experiment with more than 5000 electrophoresis diagrams, a method was developed (Method 3), using very small samples of fresh unconcentrated or even diluted juices, in which the proteins were labelled with ¹³¹I before paper electrophoresis. A quantity of 3 to 5 μ g proteins is sufficient for each separation. The method is described in detail. Results are shown in saliva, gastric juice and pancreatic juice. 9, 11 and 7 fractions respectively, were generally found. Comparison with methods in which the juices have to be concentrated considerably suggest strongly that such high concentration may give rise to the association of the protein molecules, thus invalidating more or less the results of the separation.

After having worked out a standard method, patterns were obtained that were sufficiently constant to give "normal values". This is demonstrated for saliva. However, split bands, small subfractions and small extra bands frequently appeared. The significance of such changes is not yet clearly understood.

The protein patterns of saliva, gastric and pancreatic juice have much in common. The mucus and mucoid substances are richest in the juices that come into contact with solid foodstuffs, suggesting that they have a mechanical function.

REFERENCES

- ¹ A. J. REID, *Thesis*, University of Alabama, 1952.
- ² T. KINERSLEY, *Yale J. Biol. and Med.*, 26 (1953) 211.
- ³ B. DREVON AND R. DONILIAN, *Compt. rend. soc. biol.*, 150 (1956) 1206.
- ⁴ J. R. PATTON, *Thesis*, University of Alabama, 1956.
- ⁵ J. R. PATTON AND W. PIGMAN, *Science*, 125 (1957) 1292.
- ⁶ W. PIGMAN, *J. Am. Dental Assoc.*, 54 (1957) 469.
- ⁷ L. ZIPKIN, E. R. ADAMIK AND H. A. SAROFF, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 95 (1957) 69.
- ⁸ B. C. PUGH, G. B. J. GLASS AND S. WOLFF, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 79 (1952) 674.
- ⁹ R. F. SCHILLING, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 83 (1953) 506.
- ¹⁰ A. L. LATNER AND C. C. UNGLEY, *Brit. Med. J.*, (1953, I) 467.
- ¹¹ A. L. GROSSBERG, B. A. KOMAROV AND K. SHAY, *Am. J. Physiol.*, 165 (1951) 1.
- ¹² L. NORPOTH, J. CLOESGES, M. FINGER AND M. SCHULTZE, *Deut. Med. Wochschr.*, 77 (1952) 563.
- ¹³ N. HENNING AND H. KINZLMEIER, *Deut. Med. Wochschr.*, 77 (1952) 998.
- ¹⁴ M. H. MACK, S. WOLFF AND K. STERN, *J. Clin. Invest.*, 32 (1953) 862.
- ¹⁵ L. NORPOTH, T. SURMAN AND J. CLOESGES, *Klin. Wochschr.*, 31 (1953) 1005.
- ¹⁶ R. GRASSBECK, *Gastroenterologia*, 84 (1955) 99.
- ¹⁷ S. RAMBARAN MISHRE, *Thesis*, State University, Utrecht, 1955.
- ¹⁸ G. B. J. GLASS, L. STEPHANSON AND M. RICH, *Federation Proc.*, 15 (1956) 75.
- ¹⁹ KOICHI SHINODA, *Nippon Naikagakkai Zasshi*, 45 (1956) 348.
- ²⁰ G. BARRAGALLO-SANGIORGI, *Minerva gastroenterol.*, 2 (1956) 20.
- ²¹ G. B. J. GLASS, L. STEPHANSON AND M. RICH, *Gastroenterologia*, 86 (1956) 384.
- ²² J. C. M. VERSCHURE, *Clin. Chim. Acta*, 1 (1956) 38.
- ²³ J. C. M. VERSCHURE AND P. F. MIJNLIEFF, *Clin. Chim. Acta*, 1 (1956) 154.
- ²⁴ P. DESSI AND R. PELLEGRINI, *Klin. Wochschr.*, 35 (1957) 34.
- ²⁵ P. DESSI AND M. CRESTI, *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 33 (1957) 495.
- ²⁶ M. P. MUNRO AND J. E. THOMAS, *Am. J. Physiol.*, 145 (1945) 140.
- ²⁷ G. M. BYRNE, J. I. PHINNEY, M. SCHACHTER AND E. G. YOUNG, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 683.
- ²⁸ A. L. GROSSBERG, S. A. KOMAROW AND H. SHAY, *Am. J. Physiol.*, 168 (1951) 269.
- ²⁹ H. A. ROTHSCHILD AND L. C. U. JANGUEIRA, *Nature*, 178 (1956) 258.
- ³⁰ MASAYOSHI SHIGYO, *Fukuoka-Igaku Zasshi*, 48 (1957) 123.
- ³¹ E. KOIW AND A. GRÖNWALL, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 4 (1952) 244.
- ³² C. B. LAURELL AND N. SKOOG, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 8 (1956) 21.
- ³³ N. VEALL, J. D. PEARSON AND T. HANLEY, *Brit. J. Radiol.*, 28 (1955) 633.
- ³⁴ O. P. FOSS, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 10, suppl. 31 (1957) 269.
- ³⁵ W. L. HUGHES, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 70 (1957) 3.

APPLICATION DIAGNOSTIQUE DE L'ENZYMO-ÉLECTROPHORÈSE DES DÉSHYDROGÉNASES DE L'ACIDE LACTIQUE

R. J. WIEME

Laboratoire de la Clinique Médicale, Université de Gand (Belgique)

Par enzymo-électrophorèse nous entendons une technique spéciale d'étude des enzymes. Elle utilise les propriétés optiques d'un gel de gélose qui sont très favorables et qui permettent de suivre certaines réactions enzymatiques par photométrie directe dans ce gel. Nous avons montré qu'il est possible d'exécuter directement dans une plaque de gélose un test enzymatique optique selon les modalités classiques développées par Warburg¹. L'enzymo-électrophorèse combine donc une électrophorèse en gélose à un test enzymatique optique appliqué dans ce gel.

Nous nous rendons compte du fait que le terme d'enzymo-électrophorèse semble assez mal convenir parce qu'il évoque simplement l'idée de l'électrophorèse d'un enzyme, électrophorèse qui serait suivie par une détermination de l'activité après élution ou encore en appliquant directement une technique histochimique. Nous avons cependant comme argument en faveur du choix de cette terminologie le fait qu'il existe une analogie de principe avec l'immuno-électrophorèse de Grabar. Dans cette dernière technique on opère également un fractionnement par l'électrophorèse dans un gel de gélose après quoi on introduit par diffusion un réactif spécifique. Le réactif spécifique est l'anticorps précipitant, introduit à partir de 2 réservoirs latéraux. Dans l'enzymo-électrophorèse, après séparation dans un gel de gélose, on introduit également un réactif spécifique par diffusion, mais cette fois-ci à partir d'une deuxième couche de gélose placée sur la première après l'électrophorèse. Comme la distance qui sépare l'enzyme et son réactif spécifique, qui est le substrat, est très petite et comme en général le substrat est une substance d'un poids moléculaire peu élevé, le contact s'opère très rapidement et l'activité enzymatique peut être décelée déjà après un temps très court qui sera de l'ordre d'une minute.

TECHNIQUE

Prenons comme exemple l'enzymo-électrophorèse de la déshydrogénase de l'acide lactique. Cet enzyme catalyse la réduction de l'acide pyruvique en acide lactique en présence d'un donateur d'hydrogène qui est le DPNH (forme réduite de la diphosphopyridine nucléotide). Cette substance possède la propriété d'être très peu transparente aux rayons ultraviolets, tandis que la forme oxydée (le DPN) est parfaitement transparente aux mêmes rayons. On peut donc suivre l'activité enzymatique en notant les variations d'extinction qui reviennent aux transformations dans le couple DPNH-DPN. Lorsqu'il s'agit de retrouver cet enzyme dans un mélange de protéines on procède comme suit. On pratique une électrophorèse sur lamelle porte-objet d'après une technique décrite ailleurs². Il est en effet exclu d'utiliser un format plus grand si l'on utilise le DPNH, ce produit étant assez onéreux. L'emploi d'une électropho-

rèse sur lamelle porte-objet ne comporte évidemment aucun désavantage, bien au contraire³.

Après séparation du mélange on pose sur la première, une deuxième couche de gélose qui vient d'être fraîchement coulée et qui contient (1) le *tampon* destiné à assurer une bonne activité enzymatique, (2) le *substrat* qui, dans ce cas-ci, est l'acide pyruvique et (3) *révélateur* de l'activité enzymatique qui est le DPNH. La composition de cette plaque sera la suivante:

-
- | | |
|-----|--|
| 2 | ml d'un tampon au véronal pH 8.4 $\mu = 0.1$, contenant 2% de gélose, |
| 0.1 | ml d'une solution molaire de pyruvate sodique, |
| 1 | ml d'une solution de DPNH dans de l'eau bidistillée, contenant 2 mg du produit |
| | commercial (DPNH Boehringer, Mannheim) par ml, |
| 1 | ml d'eau bidistillée. |
-

Immédiatement après avoir réuni ces deux couches de gélose, la plaque est transportée dans un photomètre (photomètre Eppendorf utilisé à 366 m μ) et une ligne de base est établie. Dans ce but on déplace la préparation dans la lumière devant la fente optique (0.2 \times 8 mm) et on note l'extinction à chaque pas. En principe on obtiendra une droite parallèle à l'axe du déplacement puisque l'extinction sera constante sur toute l'étendue de la plaque. En fait cette ligne de base présentera quelques déviations qui seront dues à des irrégularités dans le gel de gélose.

Après 2 minutes, le contact entre enzyme et substrat s'est établi et déjà l'oxydation du DPNH s'amorce: à l'emplacement exact d'une activité enzymatique l'opacité de la plaque diminue et dans la ligne de base apparaissent un ou plusieurs creux.

A ce moment on peut placer la préparation sur un de ces minimums et en suivre l'évolution en notant l'extinction à chaque minute. On obtient une courbe qui est l'image de la cinétique de cette réaction.

On peut également parcourir la plaque à des intervalles réguliers, obtenant ainsi une série de courbes qui dessinent l'évolution des pics et qui permettent une localisation exacte de l'activité enzymatique avec mesure de la mobilité électrophorétique.

On peut également procéder à une localisation précise de cette activité enzymatique par rapport aux fractions protéiniques. Dans ce but, lorsqu'on juge la plaque suffisamment développée, on pratique une incision dans le gel à l'endroit précis des minimums respectifs et l'on transporte la plaque dans un bain fixateur, après quoi on colore les protéines selon les techniques habituelles.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le dosage dans le sang de la déshydrogénase de l'acide lactique présente en clinique un intérêt certain. Nous avons donc essayé de localiser, par l'enzymo-électrophorèse, cet enzyme parmi les protéines du sang lors de l'électrophorèse.

Nous avons été avertis par des collègues de l'Université de Munich que les résultats seraient assez décevants. Ceux-ci avaient essayé de localiser cette activité par l'électrophorèse sur papier suivie d'une élution et ils avaient trouvé que toutes les fractions globuliniques du sérum humain étaient actives; ils admettaient donc l'existence d'une adsorption passive de cet enzyme sur les fractions protéiniques*.

Nous avons, de notre part, pu constater l'existence de quatre pics négatifs lors de l'enzymo-électrophorèse, mais le maximum de l'activité enzymatique ne correspon-

* Cette observation a été publiée depuis. Voir ENGELHARDT-GÖLKE *et al.*⁴.

dait en aucun cas exactement au maximum d'une fraction protéique. La Fig. 1 reproduit une de ces expériences, obtenu sur un sérum normal. Le pic le plus rapide, localisé par une incision dans le gel de gélose, se place entre l'albumine et l' α_1 -globuline; le pic un peu moins rapide se place sur le front des α_2 -globulines, le pic encore plus lent entre la β_1 - et la β_2 -globuline et enfin le pic le plus lent sur le front des γ -globulines.

Nous avons fidèlement retrouvé ces localisations dans tous les sérums normaux et dans la grande majorité des sérums présentant une augmentation pathologique de cette activité enzymatique. Existents-ils donc quatre enzymes différents dans le sérum humain possédant une activité de déshydrogénase de l'acide lactique? La preuve directe n'est pas encore faite. Nous croyons qu'il y a des arguments en faveur de cette

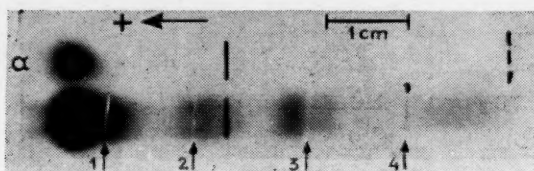


Fig. 1. Localisation des déshydrogénases de l'acide lactique présentes dans un sérum humain normal par rapport aux fractions protéiques classiques. Electrophorèse: pH 8.4, véronal, ionicité = 0.05, 23 min, 20 V/cm. Les déshydrogénases sont localisées par une incision dans le gel à l'endroit du maximum de l'activité enzymatique. La révélation des fractions protéiques est faite par une coloration au noir amidon. Il n'y a pas de correspondance exacte entre les fractions protéiques révélées et la localisation des enzymes. En a se trouve le mélange de référence (albumin/macrodex) qui permet le calcul de mobilités relatives. Trait plein = ligne de départ. Trait pointillé = macrodex.

conception. En effet nous avons également examiné par l'enzymo-électrophorèse des tissus humains en soumettant à une électrophorèse directe de minuscules fragments tissulaires. A chaque fois nous avons trouvé cinq fractions. Les quatre fractions les plus rapides possèdent une mobilité analogue aux quatre pics qu'on trouve dans le sérum. La fraction la plus lente, elle, ne se rencontre pas dans le sang; elle possède une mobilité de γ -globulines très lente qui est, au pH 8.4, pratiquement égale à zéro. Nous avons constaté en plus, des différences assez nettes entre les tissus quant à l'importance relative de ces cinq pics négatifs. Sous cet angle on peut distinguer 3 groupes (Fig. 2). Dans un premier groupe dominant les fractions à mobilités lentes, dans un deuxième dominant les fractions rapides, tandis que dans un troisième groupe, aucune des cinq fractions ne domine nettement. Le premier groupe a comme représentant principal le tissu hépatique, le second groupe le muscle cardiaque et enfin le troisième groupe le tissu rénal.

Généralement on place l'origine des enzymes sériques dans les tissus. L'augmentation de cette activité enzymatique dans le sang lors d'un infarctus du myocarde, s'explique par une libération de cet enzyme à partir du muscle cardiaque. Dans ce cas on s'attendrait à une augmentation qui frappe surtout les fractions rapides que révèle l'enzymo-électrophorèse dans le sérum humain. Par contre, lors d'une hépatite l'augmentation de l'activité enzymatique proviendrait d'une nécrose du tissu hépatique et l'on devrait pouvoir observer une augmentation des fractions lentes.

Ces vues sont confirmées par l'expérience: nous avons retrouvé très régulièrement une augmentation des fractions rapides lors de l'infarctus du myocarde tandis qu'une hépatite se signale par une augmentation des fractions lentes. Dans ce dernier cas il est cependant à noter que les fractions lentes (les fractions 3 et 4), ont tendance à fusionner et qu'il est parfois difficile de les séparer nettement. Une aug-

mentation de l'activité des déshydrogénases de l'acide lactique dans le sérum peut également être trouvée dans certains cas de leucémie et encore dans des cas de carcinose ou de réticulo-sarcomatose. Nous avons trouvé dans ces conditions une augmentation globale des quatre fractions sériques.

Dans le service du Prof. REGNIERS nous avons déjà eu l'occasion d'utiliser les avantages que peut présenter une telle distinction. Nous nous proposons d'exposer ces cas, typiquement cliniques, dans une autre communication.

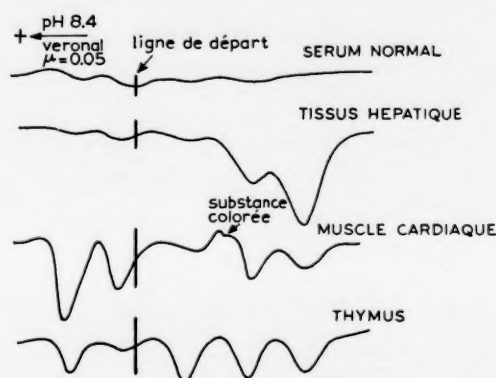


Fig. 2. Courbes obtenues par enzymo-électrophorèse représentant la distribution des déshydrogénases de l'acide lactique dans le sérum humain normal ainsi que dans divers tissus humains. La cinquième fraction tissulaire (la plus lente) ne se retrouve pas dans le sérum humain. Electro-phorèse: pH 8.4, véronal, ionicité = 0.05, 23 min, 20 V/cm.

CONCLUSION

L'enzymo-électrophorèse des déshydrogénases de l'acide lactique permet donc de différencier divers états pathologiques qui sont la cause d'une augmentation globale de cette activité enzymatique dans le sérum. Il s'agit là d'une technique relativement simple qui donne rapidement ses résultats.

RÉSUMÉ

Après un bref rappel du principe qui est à la base de l'enzymo-électrophorèse, l'auteur décrit son application à l'étude des déshydrogénases de l'acide lactique présentes dans le sérum humain normal. Quatre fractions de mobilité électrophorétique différente s'y manifestent. Lors de l'infarctisme du myocarde les fractions rapides sont nettement augmentées; dans l'hépatite les fractions lentes dominent, tandis que dans les leucémies ou les carcinoses on note une augmentation globale des quatre fractions. Ces différences s'expliquent par une distribution inégale des fractions enzymatiques dans les tissus correspondants.

L'enzymo-électrophorèse permet donc de préciser l'origine d'une augmentation globale de l'activité des déshydrogénases de l'acide lactique dans le sang.

SUMMARY

DIAGNOSTIC APPLICATION OF THE ENZYMO-ELECTROPHORESIS OF LACTIC ACID DEHYDROGENASES

After giving a brief review of the principle underlying enzymo-electrophoresis, the author describes its application to the study of lactic acid dehydrogenases in

normal human serum. Four fractions of different electrophoretic mobilities were found. In myocardial infarction, the rapid fractions were clearly augmented, while in hepatic sera the slow fractions were predominant; in leukemic and carcinomatic sera, the total of all four fractions was found to be higher. These differences are attributed to the uneven distribution of the enzyme fractions in the tissues involved.

The source of an increase in the activity of lactic acid dehydrogenases in human blood can thus be located by means of enzyme-electrophoresis.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. J. WIEME, *Conférence aux Behring Werke, Marburg, Avril 1957*, à paraître dans les *Behringwerke Mitt.*
- ² R. J. WIEME ET M. RABAEY, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 112.
- ³ R. J. WIEME, *Clin. Chim. Acta*, à paraître.
- ⁴ A. ENGELHARDT-GÖLKE, R. LÖBEL, W. SEITZ ET I. WOLLER, *Klin. Wochschr.*, 36 (1958) 462.

ERFAHRUNGEN MIT DER QUANTITATIVEN AMINOSÄURE-BESTIMMUNG AN IONENAUSTAUSCHERSÄULEN UND AUTOMATISCHER REGISTRIERUNG DER ERGEBNISSE

K. HANNIG

Max-Planck-Institut für Eiweiss- und Lederforschung, München (Deutschland)

In einer kurzen Mitteilung berichteten SPACKMANN, STEIN UND MOORE¹ über eine automatisch arbeitende Anordnung zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Aminosäuren mit Hilfe von Ionenaustauschersäulen. Bei Ausschaltung aller subjektiven Fehlermöglichkeiten werden dabei die einzelnen Aminosäuren nach der Trennung in der Säule durch ein kontinuierliches, selbst registrierendes kolorimetrisches Verfahren erfasst, wobei jede Aminosäure als eine symmetrische Gauss-Kurve erscheint.

In Anlehnung an diese Mitteilung haben wir eine Apparatur entwickelt, deren Aufbau und Arbeitsweise im folgenden beschrieben werden soll.

PRINZIP

Das Prinzip ist verhältnismässig einfach. Dem aus der Ionenaustauschersäule austretenden Eluat wird innerhalb eines Kapillarrohres im konstanten Mischungsverhältnis und mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Pumpe das Ninhydrinreagens zugeführt. Die Elutionsgeschwindigkeit durch die Säule beträgt 30 ml/St., die Geschwindigkeit der Ninhydrinzuführung 15 ml/St. Die Farbentwicklung erfolgt innerhalb von 20 min in einem Teflonschlauch von 1 mm lichter Weite, der sich aufgerollt in einem siedenden Wasserbad befindet. Anschliessend durchfliessen die angefärbten Komponenten eine Messküvette. Durch eine automatisch registrierende Photometereinrichtung können schliesslich die einzelnen Extinktionen fortlaufend aufgezeichnet werden.

APPARATUR*, **

Fig. 1 zeigt die Gesamtansicht der Apparatur in unserem Laboratorium. Zur Trennung der nichtbasischen Aminosäuren dienen Trennsäulen Tr. 1, 2 von 0.9 cm lichter Weite und 130 cm Gesamtlänge. Das eigentliche Adsorptionsrohr ist mit einem Heizmantel umgeben, in dem Wasser von $50^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$ aus einem Thermostaten Th mit Umlaufpumpe U zirkuliert. Die Füllung der Säulen bildet der stark saure Kationenaustauscher Dowex-50 X 8 400–800 mesh, der nach der üblichen Reinigung² und Überführung in die Natriumform² durch ein Sieb von 0.05 mm Maschenweite getrieben wurde. Diese feine Verteilung des Austauschers ist nötig, wenn die Säule mit

* Die komplette Trennapparatur wird durch die Firma Bender und Hobein, München, Lindwurmstrasse 71 in den Handel gebracht.

** Eine ausführliche Beschreibung der automatischen Aminosäurebestimmungsapparatur nach SPACKMANN, STEIN UND MOORE ist inzwischen erschienen⁷.

einer Elutionsgeschwindigkeit von 30 ml/St. durchströmt werden soll. Da einerseits bei diesen verhältnismässig hohen Strömungsgeschwindigkeiten ein erheblicher Druck überwunden werden muss und andererseits die gleichmässige Dosierung eine wesentliche Voraussetzung zur Erzielung reproduzierbarer, quantitativer Ergebnisse ist, erfolgt die Zuführung des Elutionsmittels ebenfalls durch eine Pumpvorrichtung P (Fig. 1). Sie besteht im wesentlichen aus 3 Glasspritzen G 1–G 3 von 250 ml Inhalt, deren gut eingeschliffene Kolben mit Dichtungsringen über ein Getriebe von einem

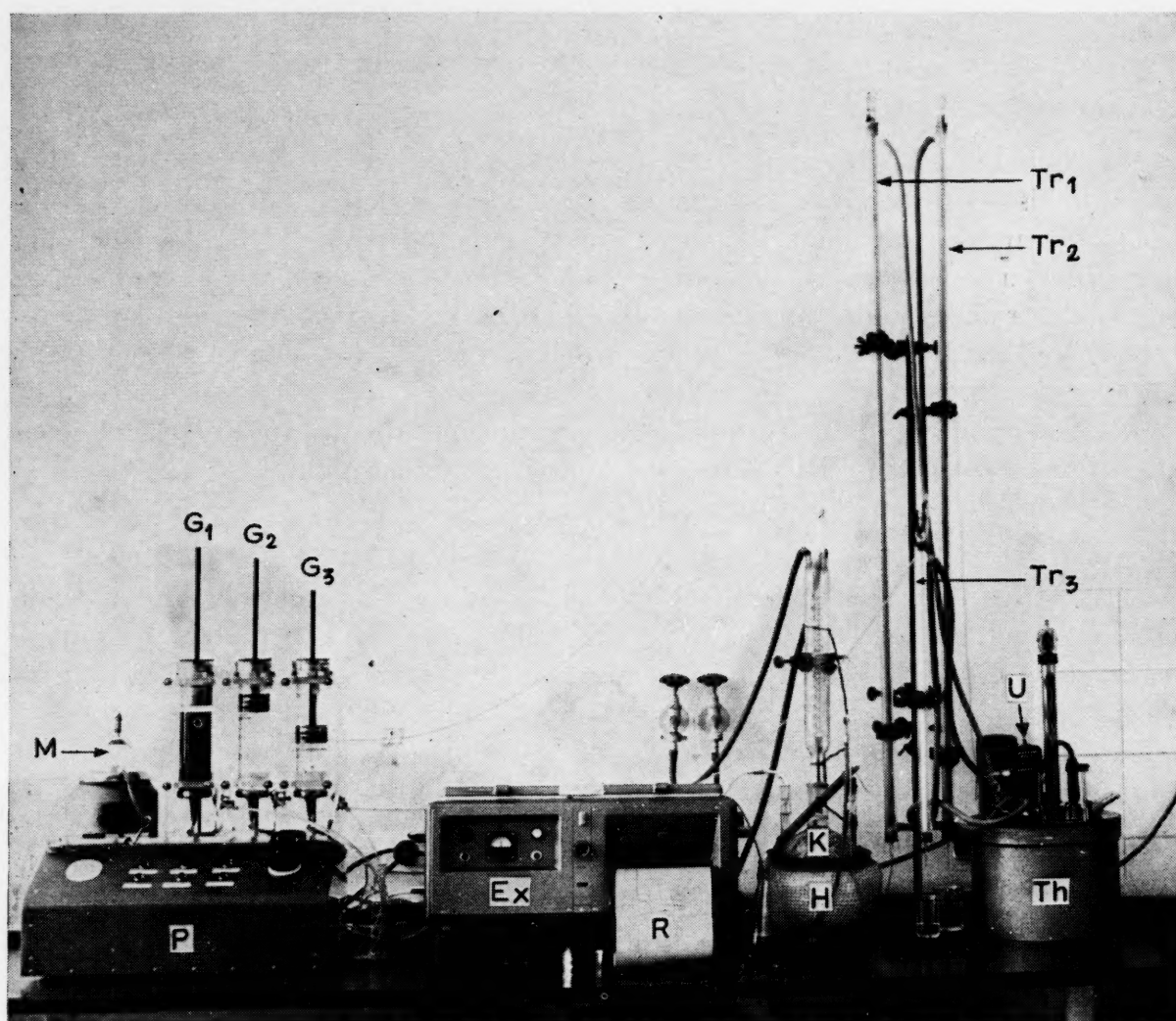


Fig. 1. Gesamtansicht der Trennapparatur. Tr 1, 2 = Trennsäulen mit Heizmantel zur Trennung der nichtbasischen Aminosäuren (Dowex-50 X 8); Tr 3 = Trennsäule mit Heizmantel zur Auftrennung der basischen Aminosäuren (Amberlite IRC 50); Th = Thermostat; U = Umlaufpumpe; K = Dreihalskolben mit siedendem Wasser, darin ein etwa 20 m langer Teflonschlauch; H = Pilzheizhaube; Ex = Extinktionsschreiber; R = Registrierstreifen; P = Pumpvorrichtung; G 1 = Kolbenspritze für das Ninhydrinreagens; G 2, 3 = Pufferspritzen; M = Mischgefäss mit Magnetrührer.

Synchronmotor gleichmässig vorwärts bewegt werden. Die Spritzen werden vor Beginn des Versuches durch Hochkurbeln der Kolben mit den Reagenslösungen gefüllt, Spritze G 1 mit Ninhydrinreagens, G 2 und G 3 mit Pufferlösungen. Die Vorschubgeschwindigkeiten der Kolben sind so bemessen, dass die beiden Pufferspritzen 30 ml/St. Flüssigkeit fördern, während die Ninhydrinspritze mit der halben Geschwindigkeit arbeitet (15 ml/St.). Das Austrittsrohr der Säule ist mit einem Kapillarschlauch verbunden, an dem sich ein T-Stück anschliesst. Durch den einen Schenkel

des T-Stückes fließt zu dem Eluat die Ninhydrinlösung und vermischt sich hier mit diesem. Es schliesst sich ein etwa 20 m langer Teflonschlauch von 0.8–1 mm lichter Weite an, der sich in einem siedenden Wasserbad, gebildet aus dem Dreihalskolben K mit Rückflusskühler und der Pilzheizhaube H, befindet. Die aus dem Teflonschlauch austretenden gefärbten Aminosäuren durchfließen eine schmale Messküvette von 3 mm Schichtdicke.

Zur Registrierung der Extinktionen verwenden wir einen *Extinktionsschreiber*³, der sich schon früher für die Ausmessung von Elektrophoresestreifen nach dem *Transparenzmessverfahren*⁴ bewährt hat, mit der Abänderung, dass an Stelle des Elektrophoresestreifens die Messküvette in den Lichtstrahl zwischen Spalt und Photozelle gelegt wird. Der Extinktionsschreiber Ex, der mit einer Quecksilberdampfampe als Lichtquelle ausgestattet ist, wird so gesteuert, dass jeweils nach einer Minute durch eine Kontaktwalze der Messvorgang ausgelöst wird, wobei die ermittelte Extinktion auf einem Registrierstreifen R, welcher sich pro Minute um 1 mm fortbewegt, eingestochen wird. Im Verlauf des Versuches erhält man somit einen zusammenhängenden Kurvenverlauf der gemessenen Einzelextinktionen. Die Verwendung einer Filterwechseleinrichtung, die zusätzlich in das Auswertgerät eingebaut werden kann, erlaubt die Messung der Extinktion jeweils bei 2 verschiedenen Wellenlängen, nämlich bei 436 m μ für die Prolin- und Oxyprolinfärbung und 578 m μ für die übrigen Aminosäuren. Durch diese Massnahme ist es möglich, mit einem Photometer gleichzeitig 2 übereinanderliegende Kurven zu schreiben, wobei man jeweils die Gausskurve auswertet, die dem Absorptionsmaximum der Aminosäurefärbung entspricht.

ARBEITSWEISE

Zur Durchführung des Versuches werden 0.2–1 ml der zu trennenden Aminosäurelösung (Proteinhydrolysat entspr. 1–2 mg Protein), deren pH nicht über 2.5 sein darf, auf die Säule aufgetragen und dreimal mit je 0.3 ml Citratpuffer pH 2.2 nachgewaschen. Dann füllt man die Säule bis zum Schliffansatz mit dem gleichen Puffer und stellt sofort, ohne dass sich eine Luftblase bilden kann, durch einen Schliff und Kapillarschlauch die Verbindung mit der Pumpvorrichtung her. Die Elution der Säule geschieht zunächst mit 0.2 M Citratpuffer von pH 3.1 (30 ml/St.). Die Temperatur des durch den Heizmantel der Säule zirkulierenden Wassers wird während der ganzen Dauer des Versuches konstant auf 50° gehalten. Nach etwa 2 Stunden Elutionszeit wird das Ninhydrinreagens kontinuierlich dem Eluat zugeführt (15 ml/St.).

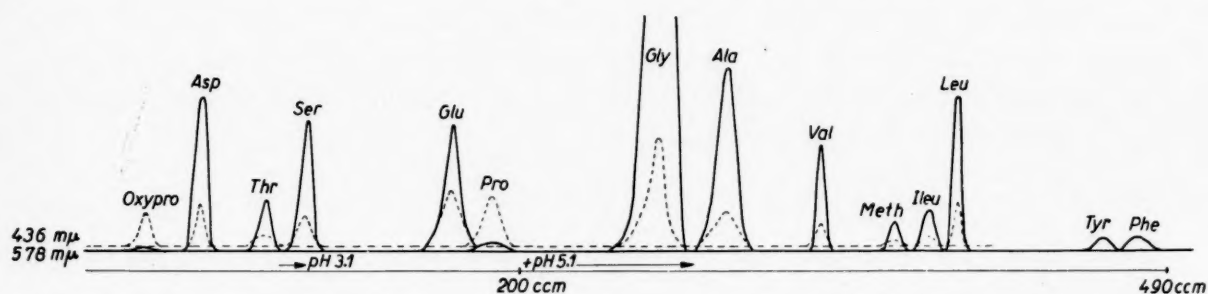


Fig. 2. Auftrennung der nichtbasischen Aminosäuren am Beispiel eines Kollagenhydrolysates. — Kurvenverlauf gemessen bei 578 m μ . - - - - Kurvenverlauf gemessen bei 436 m μ .

Nachdem der Prolingipfel erschienen ist, bzw. nach Durchtritt von 210 ml Puffer pH 3.1, wird der pH-Wert der Elutionsflüssigkeit allmählich auf pH 5.1 gebracht.

Man führt dazu einen 0.2 M Citratpuffer vom pH 5.1 aus der 2. Pufferspritze G 3 (Fig. 1) zunächst in ein Mischgefäß M, in dem sich noch 100 ml des Puffers pH 3.1 befinden, und von hier auf die Säule. Mit Hilfe eines Magnetrührers erfolgt eine innige Durchmischung, sodass während des weiteren Verlaufs der Trennung der pH-Wert kontinuierlich ansteigt.

Der Pufferwechsel erfolgt praktisch so, dass man durch entsprechende Stellung eines 3-Wege-Hahnes und Einkuppeln der 2. Pufferspritze ohne Unterbrechung des Versuches die Umstellung vornehmen kann.

7½ Stunden nach dem Pufferwechsel haben sämtliche nichtbasischen Aminosäuren die Säule durchwandert, und nach einer weiteren halben Stunde kann die Apparatur ausgeschaltet werden, was einfach durch Unterbrechung des Hauptstromkreises mit einer Kontaktur erfolgen kann.

Fig. 2 zeigt das Ergebnis einer Trennung der nichtbasischen Aminosäuren am Beispiel eines Kollagenhydrolysates. Die einzelnen Aminosäuren erscheinen sehr scharf getrennt in Form symmetrischer Gausskurven. Da mit dem "Extinktionsschreiber" durch das angewandte Kompensationsmessverfahren *Extinktionswerte* aufgezeichnet werden, die der Konzentration direkt proportional sind, kann das Ergebnis der Trennung ohne besondere Umrechnung einfach durch Ausplanimetrieren der Flächen der einzelnen Gausskurven erhalten werden, wobei jedoch die etwas unterschiedliche Anfärbbarkeit der einzelnen Aminosäuren zu berücksichtigen ist. Am besten ist es, wenn man das Ergebnis der Trennung aus den erhaltenen Werten einer genau eingewogenen Testmischung errechnet.

Wir halten im Gegensatz zu der säulenchromatographischen Arbeitsweise von MOORE UND STEIN² die Natriumionenkonzentration sämtlicher Pufferlösungen konstant und vermeiden dadurch ein Schrumpfen der Säulenfüllung. Auch das Regenerieren der Säulen nach jedem Versuch geschieht durch Durchsatz von 100 ml 0.2 N NaOH und anschliessender Elution mit 100 ml 0.2 M Citratpuffer pH 3.1. Wenn alle Elutionsflüssigkeiten durch vorheriges Auskochen und Übersichten mit Paraffinöl vollkommen luftfrei gehalten werden, vermeidet man eine Bildung und Ansammlung von Luftblasen in der Säule, die schliesslich zum Reißen der Füllung führen würde. Die Säulen sind fast beliebig oft ohne Neufüllung wieder zu verwenden.

Zur Trennung der basischen Aminosäuren verwenden wir den Ionenaustauscher Amberlite IRC 50 mit einer Korngrösse $< 0.12 \text{ mm}^5$. Die Säulen können wesentlich kürzer gehalten werden, der innere Durchmesser beträgt 0.6 cm, die Länge 50 cm. Die Durchströmungsgeschwindigkeit mit einem 0.2 M Citratpuffer pH 7.0 durch die Säule beträgt ebenfalls 30 ml/St., die Heiztemperatur jedoch nur 40°. Unter diesen Bedingungen werden, wie dies Fig. 3 zeigt, die basischen Aminosäuren und Ammoniak sehr gut getrennt, während die neutralen Aminosäuren als gemeinsamer Gipfel als erste die Trennsäule verlassen.

Fehlerbreite

Zur Prüfung der Frage, ob die Flächeninhalte der Gausskurven proportional zur Aminosäurekonzentration erhalten werden, haben wir zunächst steigende Mengen einer Reihe einzelner Aminosäuren hintereinander auf die Säule gesetzt und die erhaltenen Gausskurven planimetriert. Fig. 4 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Bis zu Konzentrationen von 3 μMol wurde eine ausgezeichnete Linearität der Flächenwerte in Abhängigkeit von der Aminosäuremenge gefunden. Aus den verschiedenen Nei-

gungswinkeln der erhaltenen Eichkurven kann man die unterschiedliche Anfärbbarkeit der einzelnen Aminosäuren ermitteln.

Über die Fehlerbreite der Methode geben die Ergebnisse in Tab. I Auskunft.

In der Zusammenstellung ist das Ergebnis einer 6-fach-Bestimmung an ein und demselben Aminosäurehydrolysat wiedergegeben. Die Zahlen in den vertikalen Spalten I–VI entsprechen den gefundenen Planimeterwerten für die einzelnen Amino-

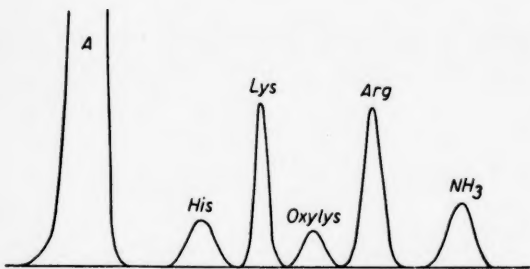


Fig. 3. Auftrennung der basischen Aminosäuren. Gemessen bei 578 mμ; A = gemeinsamer Gipfel der nichtbasischen Aminosäuren.

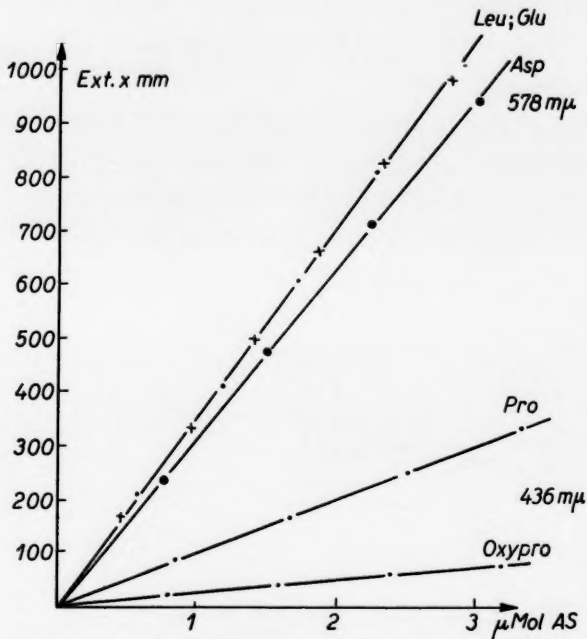


Fig. 4. Eichkurven. Abszisse: Menge der Aminosäuren in μMol. Ordinate: Flächenwert der erhaltenen Gausskurven in Ext. mm.

TABELLE I
ERMITTLUNG DER FEHLERBREITE AN EINER SECHSFACH-BESTIMMUNG

	I	II	III	IV	V	VI	Mittelwert	Mittl. Fehler in % vom Wert
Oxypro	37	36	35	40	36	39	37	± 5.24
Asp	232	229	239	232	238	235	234	± 1.65
Thr	74	78	76	71	74	70	74	± 4.05
Ser	146	148	139	143	153	148	146	± 3.25
Glu	260	276	277	270	272	265	270	± 2.42
Pro	93	93	87	89	95	91	91	± 3.25
Gly	1555	1528	1565	1561	1515	1530	1542	± 1.34
Ala	398	430	428	431	429	419	422	± 3.02
Val	105	108	101	113	112	109	108	± 4.13
Meth	43	41	44	43	44	39	42	± 4.76
Ileu	80	79	81	85	85	83	82	± 3.13
Leu	220	228	217	219	227	225	223	± 2.06
Tyr	45	44	43	44	46	42	44	± 3.21
Phe	62	60	62	66	64	63	63	± 3.26
His	68	67	68	65	62	69	67	± 3.94
Lys	140	136	145	141	140	143	141	± 2.17
Oxylys	40	38	39	36	38	39	38	± 3.71
Arg	190	185	182	180	184	187	185	± 1.93
NH ₂	186	187	182	185	186	184	185	± 0.96
Summe	3974	3991	4010	4014	4000	3980	3995	± 3.02

säuren. Durch Vergleich mit den Mittelwerten ergeben sich die in der letzten Spalte erhaltenen mittleren Fehler s.*

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist danach sehr befriedigend; sie erreicht an biologischen Untersuchungsmaterialien nahezu eine Genauigkeit, wie sie bei anorganisch-chemischen Analysen üblich ist. Der Arbeitsgang für eine vollständige Aminosäureanalyse beansprucht etwa 16 Stunden, wobei der eigentliche Arbeitsaufwand nur einen Bruchteil dieser Zeit beträgt. Die Methode ist nach unserer Meinung zur Zeit die Methode der Wahl, wenn sie auch einen gewissen Aufwand an apparativem Rüstzeug erfordert.

Sicher ist das Verfahren noch weiter ausbaufähig und auch bei der säulenchromatographischen Trennung anderer Substanzgemische anwendbar, wenn geeignete Bedingungen für entsprechende Farbreaktionen gefunden werden, oder wenn für die photometrische Auswertung die Eigenabsorption der getrennten Komponenten z.B. im UV-Bereich genutzt werden kann.

EXPERIMENTELLER ANHANG

Die Zusammensetzung der in der Beschreibung erwähnten Pufferlösungen geht aus Tabelle II hervor.

TABELLE II
PUFFERZUSAMMENSETZUNG

pH	Zusammensetzung
2.2 ± 0.05	105 g Citronensäure-Monohydrat + 42 g NaOH 97%ig + 80 ml HCl 32%ig + 5 l Wasser.
3.1 ± 0.02	210 g Citronensäure-Monohydrat + 83 g NaOH 97%ig + 135 ml HCl 32%ig + 10 l Wasser. Vor Gebrauch + 0.5 ml Thiodiglykol auf 100 ml Puffer.
5.1 ± 0.02	105 g Citronensäure-Monohydrat + 20 ml Eisessig + 47 g NaOH 97%ig + 136 g Natriumacetat · 3H ₂ O + 10 l Wasser. Vor Gebrauch + 0.5 ml Thiodiglykol + 0.5 ml Br I auf 100 ml Puffer.
7.0 ± 0.02	210 g Citronensäure-Monohydrat + 120 g NaOH 97%ig + 5 l Wasser.

Die Pufferlösungen sind durch Aufkochen luftfrei zu machen; sie werden noch heiss mit einer Schicht Paraffinöl überdeckt. Im Kühlraum aufgehoben, sind sie mehrere Wochen haltbar.

Die Bereitung des Ninhydrinreagens entspricht einer Vorschrift von MOORE UND STEIN⁶:

20 g Ninhydrin + 3 g Hydrindantin (bzw. 0.4 g SnCl₂ · 2H₂O) werden in einer Mischung aus 750 ml Methylglykol + 250 ml 4 M Acetatpuffer pH 5.5, in die zuvor einige Zeit ammoniakfreier Stickstoff eingeleitet wurde, gelöst (4 M Acetatpuffer; pH 5.5: 1360 g Natriumacetat · 3 H₂O + 250 ml Eisessig auf 2.5 l mit Wasser aufgefüllt). Das Reagens wird kühl unter Stickstoffatmosphäre in einer dunklen Flasche aufbewahrt.

ZUSAMMENFASSUNG

In Anlehnung an eine neuere Veröffentlichung von SPACKMANN, STEIN UND MOORE wurde eine automatisch arbeitende Aminosäurebestimmungsapparatur aufgebaut, welche das Ergebnis der Trennung in der Säule selbsttätig registriert. Als Ionenaustauscher wird Dowex-50-X 8 verwendet, die Trennung erfolgt bei 50°. Die Durchströmungsgeschwindigkeit beträgt 30 ml pro Stunde. Dem austretenden Eluat wird im konstanten Mischungsverhältnis und mit konstanter Geschwindigkeit Ninhy-

* $s = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n-1}}$; wobei x die Abweichung vom Mittelwert und n die Zahl der durchgeführten Bestimmungen bedeutet.

drinreagens zugeführt. Die Farbentwicklung erfolgt innerhalb von 20 Minuten in einem 20 m langen Teflonschlauch von 1 mm lichter Weite, der sich aufgerollt in einem siedenden Wasserbad befindet. Anschliessend durchfliessen die angefärbten Komponenten eine Messküvette. In einem automatisch registrierenden Photometer werden die Extinktionen fortlaufend aufgezeichnet. An Beispielen wird die Reproduzierbarkeit und Proportionalität veranschaulicht.

SUMMARY

EXPERIENCES WITH QUANTITATIVE AMINO ACID DETERMINATIONS ON ION-EXCHANGE COLUMNS AND AUTOMATIC RECORDING OF THE RESULTS

Following a recent report by SPACKMAN, STEIN AND MOORE, an apparatus was designed for amino acid determinations, with which the results of separations on columns are recorded automatically. A Dowex-50-X 8 ion-exchange column was used, and separation was effected at 50°. The flow rate was 30 ml/h. Ninhydrin reagent is added at a constant rate and in a constant ratio to the eluate as it leaves the column. The colour develops within 20 min in a 20 m long Teflon tube of 1 mm inner diameter, which is rolled up and immersed in a boiling water-bath. The stained compounds then flow through a measuring cell and the extinctions are continuously registered by means of an automatic recording photometer. Examples are given to illustrate the proportionality and reproducibility.

LITERATUR

- ¹ D. H. SPACKMANN, W. H. STEIN UND ST. MOORE, *Federation Proc.*, 15 (1956) 358.
- ² ST. MOORE UND W. G. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 663; 211 (1954) 907.
- ³ H. EBERLE, *Naturwissenschaften*, 41 (1954) 479.
- ⁴ W. GRASSMANN UND K. HANNIG, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 838.
- ⁵ S. ISCHII, *J. Biochem.*, 43 (1956) 531.
- ⁶ ST. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
- ⁷ D. H. SPACKMANN, W. H. STEIN UND ST. MOORE, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1190.

COLOURED SUBSTANCES AS AN EXPERIMENTAL TOOL IN THE STUDY OF ELECTROPHORETIC TECHNIQUES

H. PEETERS AND P. VUYLSTEKE

Laboratory, St. Jans Hospital, Bruges (Belgium)

In experimental work on electrophoresis it is important to follow the conditions of a given experiment continuously and for this purpose several coloured substances have proved to be very useful.

When starting to work with a given method one ought first to check the hydrodynamics of the system. For this purpose a dye such as eosin can be used. To find out whether hydrostatic pressure is influencing the field, an experiment is made without applying current and eosin spots are applied at regular intervals on the medium. The migration of these spots is then followed.

In two-dimensional techniques, the influences of the electrodes on the centre field and the regularity of the arrival of the buffer at the upper edge of the supporting medium can easily be studied in this way. Therefore the eosin spots are applied over the entire surface (Fig. 1). If the water moves from the centre field to the electrodes or vice-versa the spots will not migrate vertically but will deviate towards the electrode or towards the centre field.

After having ascertained that hydrostatic equilibrium has been attained the influence of evaporation should be examined¹. The same experiment is repeated but now an alternating current is applied. Under these conditions the dye will not migrate and any deviation will be due to an evaporation current caused by the generation of Joule heat. To obtain a Joule heat generation equivalent to that caused by a direct current of the same intensity, the potential to be applied should be corrected by the factor 1.4, as the measured potential of an a. c. current is about 1.4 times larger than the effective potential.

With this technique it is easy to determine when vapour saturation of an electrophoretic chamber is obtained. Therefore a series of experiments is performed with a.c. and the duration of each run is increased. At the end of the experimental run, eosin spots are applied and followed. The first experiment with correct vertical lines, gives the time needed for vapour saturation and thus the "stabilizing period" under these conditions.

Another factor acting on migration is the electroendosmotic flow. To know the intensity of this flow the migration of an uncharged molecule is followed. Here glucose can be used with good results, because this substance can readily be made visible by heating².

In two-dimensional techniques a deviation from the vertical is observed³. The angle of deviation can be measured and expressed in degrees (Fig. 2). In this kind of experiments it should be borne in mind that the migration of glucose represents the sum of electroendosmotic and hydrodynamic flow, including evaporation flow. To obtain correct data on electroendosmosis, a test with eosin spots with a.c. should be done beforehand.

The most important point, however, is to get an idea of the migration and fractionation of the sample itself. For this purpose bromophenol blue can for instance be used. This substance forms a complex with albumin. If an excess is added, a part of the dye will migrate separately. Under optimal conditions, a third fraction can be isolated, which is situated between the two already mentioned. This dye renders the albumin fraction visible and thus shows its migration velocity and also its migration path. Moreover, if a wide separation of the dye is obtained a good fractionation of the serum may be expected.

This method can be applied in zone electrophoresis to observe the migration distance of the albumin fraction as a function of time. Immobilization of the dye

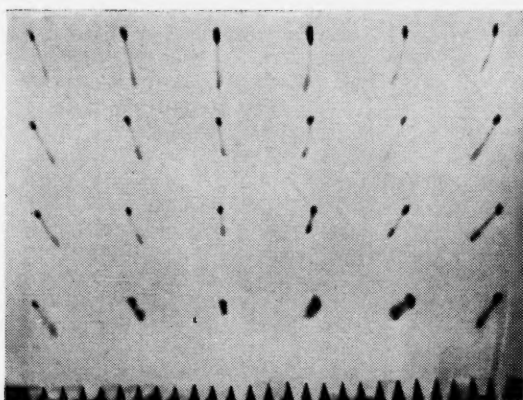


Fig. 1. Chromatography of eosin. The migration of the eosin spots shows the movement of buffer towards the centre field.

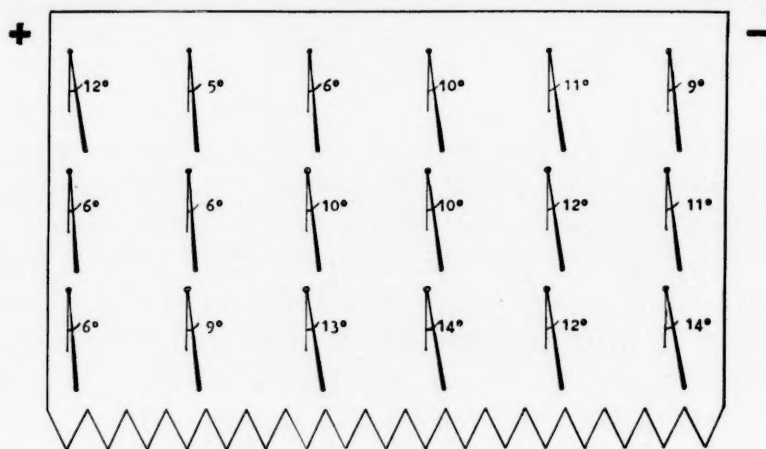


Fig. 2. Electroendosmosis in two-dimensional electrophoresis. The migration of glucose spots, revealed after the run by heating, indicates the influence of electroendosmosis. This can be expressed in degrees of deviation from the vertical

points to the presence of an evaporation flow. With low evaporation or none at all, migration continues steadily (Fig. 3).

In two-dimensional electrophoresis, not only the migration of the albumin can be observed before dyeing, but it is possible to make sure that this fraction migrates during the whole experiment along the same path. The time needed to reach the bottom of the medium can also be measured. When drying papers of large size, which is not easy to perform correctly, a continuous check should be kept.

At the end of the run the efficiency of the fractionation can be appraised by

observing the fractionation of the dye (Fig. 4). Using bromophenol blue in a run on cellulose powder plates, it was clearly seen that the migration paths became wider during the drying procedure and this was caused by an evaporation flow.

Amido Black has also been used for this purpose but as it shows great adsorption on paper, it is not suited for this type of work.

Finally it is important to know whether the pH in the field has changed, as a normal pH means a normal run. A convenient method is to spray an indicator solution over the electrophoretic field at the end of the run. The indicator is dissolved in ethanol and sprayed at a high and regular rate by means of compressed air. The paper should be dried slightly in order to prevent dripping and concentrated indicator should be used. For this purpose several indicators or mixtures of indicators are suitable. We obtained the best results with a mixture of α -bromonaphthalene and neutral red. This

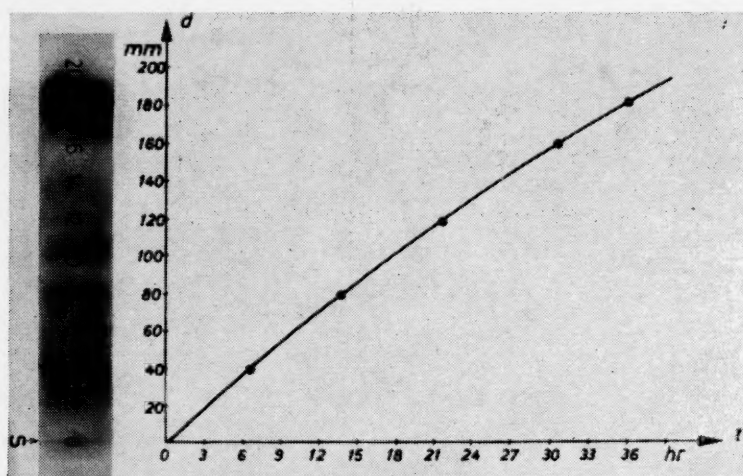


Fig. 3. Use of bromophenol blue in zone electrophoresis. A small amount of bromophenol blue is added to human serum (2 to 3 mg/ml). The bromophenol blue migrates with the albumin. Thus the migration of albumin as a function of time can be observed throughout the whole experiment. In the figure the position of the bromophenol blue is given as a function of time. After the run the strip was stained with Amido Black to render the other fractions visible. As evaporation was very low in our system, migration did not cease even after 36 h.

mixture is prepared as follows: 210 mg α -bromonaphthalene + 100 mg neutral red are dissolved in 200 ml ethanol. With this indicator a colour range from red over yellow, green to blue is obtained corresponding to a pH range from 5 to 9. It is better to delay the application of the indicator until the paper is completely dry, and to spray with a solution containing equal amounts of ethanol and water.

When the sprayed paper dries the colour of the indicator turns back into the colour of the unionized indicator. Thus the pH values must be read immediately after spraying or, even better, a colour picture should be taken. To obtain absolute values, reference strips can be used which are dipped in buffer solutions of known pH and treated in the same way as the paper to be investigated.

At this point an important remark should be made. Proteins influence the colour of indicators, and this is known under the name of "protein-error". This influence on the colour of the indicator varies with the type of protein. Albumin takes up the greatest amount of dye. Not only proteins but also other substances, such as amino acids and polypeptides, react in a similar way. When determining the pH of a substrate, this phenomenon must be taken into account.

In two-dimensional techniques where pH changes occur so easily near the electrodes, this method gives some interesting information (Fig. 5). pH changes also occur at the upper corners of the paper as the result of an electrical shunt caused by the presence of a buffer channel which feeds the sheet with buffer.

The use of these different dyes in the development of electrophoretic techniques is of great help in obtaining good reproducibility of a given method more readily.

We hope to compose indicators of greater sensitivity and also others showing a greater "protein-error". Perhaps some fractions may be more clearly revealed by this new method, than by the stains which are in use today.

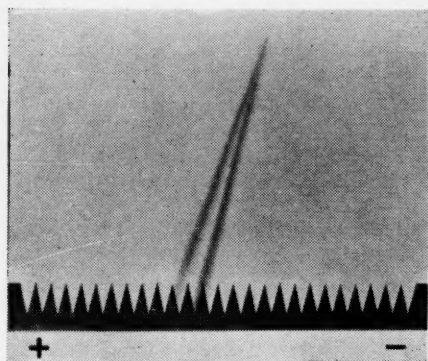
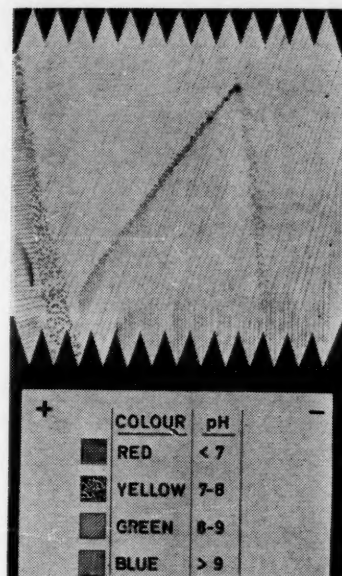


Fig. 4. Use of bromophenol blue in two-dimensional electrophoresis. Sample: human serum with bromophenol blue (5 mg/ml). Supporting medium: cellulose powder plate. During the drying procedure it could be clearly seen that evaporation flow enlarged the fractions.

Fig. 5. Use of a pH indicator in electrophoresis. After a two-dimensional electrophoretic run of human serum at pH 8.6, a pH indicator is sprayed. There is an acid pH at the anodic side and an alkaline pH at the cathodic side. The protein error can also be seen. Here the albumin has a stronger action than the γ -globulin, and the γ -globulin a stronger one than the other globulin fractions.



SUMMARY

It is important to follow the conditions of an electrophoretic experiment continuously and for this purpose various coloured substances have been used. Dyes such as eosin provide an ideal means of following the hydrodynamic factors. Even the influence of evaporation can be examined if an alternating current is used. Electroendosmosis can easily be investigated by using an uncharged molecule such as glucose, which can afterwards be made visible by heating. In order to get an idea of the migration and fractionation of proteins, it is necessary to use a substance, such as bromophenol blue, that partly forms complexes with the albumin and makes the separation visible during the run. Finally, information about the buffer structure in the medium must be obtainable. Here the pH is most important. By vaporizing an indicator on the dried supporting medium a complete picture of the pH structure of the field appears. The influence of the proteins and the buffer ions on the indicator must, however, not be overlooked.

A proper use of all these means makes it possible to obtain concrete data concerning the working conditions in electrophoresis.

REFERENCES

- ¹ M. MACHEBŒUF, J. M. DUBERT AND P. REBEYROTTE, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 346, 360.
- ² J. P. DUSTIN, in *The Protides of Biological Fluids* (Proceedings 1st Colloquium, Bruges, 1953), pp. 33-42.
- ³ H. PEETERS AND P. VUYLSTEKE in *The Protides of Biological Fluids*, (Proceedings 4th Colloquium, Bruges, 1956), De Tempel, Bruges, 1956, pp. 63-68.

CHARAKTERISIERUNG VON SPEICHELPROTEINEN

F. GABL UND E. EGGER

Medizinische Klinik und Medizinisch-chemisches Institut der Universität, Innsbruck (Österreich)

Menschlicher Speichel ist ein zwar leicht zugängliches, jedoch relativ wenig untersuchtes biologisches Substrat. Dies gilt besonders für die Eiweisskomponenten, während die Speichелелектролыte in den letzten Jahren eingehend studiert worden sind. Im Verlauf von Untersuchungen über Myelomproteine in verschiedenen Körperflüssigkeiten schien uns auch die Einbeziehung von Speichel interessant, nach dem wir in einer Arbeit von BRASS¹ einen Hinweis über das Auftreten von Proteinfällungen in den Ausführungsgängen der Glandula submandibularis gefunden hatten. Diese Eiweisspräzipitate ähnelten nach Ansicht des Autors solchen von Bence-Jones-Protein in den Harnkanälchen.

Bei Durchsicht der Literatur fanden wir nur spärliche Arbeiten über die Elektrophorese von Speichelproteinen²⁻⁹. Die bisher veröffentlichten Untersuchungen, die sich z.T. auf die Wiedergabe des Elektrophoresebildes beschränken, zeigten, dass die Eiweisszusammensetzung sowohl bei einzelnen Individuen als auch für die verschiedenen Speicheldrüsen sehr variabel ist. Die Zahl der von den verschiedenen Autoren gefundenen Proteinfractionen variiert zwischen 3 und 14. Eine nähere Charakterisierung der einzelnen Fraktionen mittels verschiedener Färbungen ist u.W. bisher nicht erfolgt, ebenso nicht der elektrophoretische Nachweis von pathologischen Eiweisskomponenten (Myelomprotein) im Speichel.

METHODIK

Substrat

Es wurde im allgemeinen Mischspeichel ohne Anwendung von Reizmitteln gesammelt. Ausnahmsweise wurde der Speichelfluss durch Kauen von Paraffin angeregt, wobei sich innerhalb einer Stunde etwa 100 ml Speichel gewinnen liessen.

Dieser wurde durch 30 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der weiss-gelbliche Bodensatz beträgt ca. 4% des unsprünglichen Volumens und enthält die bekannten Formelemente des Speichels (Epithelien, Speicheldrüsenkörperchen, Leukozyten, Bakterien). Der pH-Wert schwankt um den Neutralpunkt. Weiteres Zentrifugieren des Überstandes bei 15.000 U/min brachte ebenso wie Filtration durch Blaubandfilter keine erkennbare Veränderung mehr.

Der Eiweissgehalt des zentrifugierten Mischspeichels betrug zwischen 50 und 300 mg% und wurde nephelometrisch bzw. kjeldahlometrisch bestimmt. Dies entspricht den in der Literatur angegebenen Werten^{8, 10, 11}.

Bei der üblichen Methodik der Papierelektrophorese ist bei Auftragung von nicht konzentriertem Speichel nur unter besonders günstigen Umständen gerade noch die Anfärbung der stärksten Fraktion zu erwarten⁵. Wir haben daher in jedem Fall durch Ultrafiltration unter Überdruck auf 1/10 bis 1/50 des Ausgangsvolumens ein-

geengt. Als günstig erwies sich auch die Lyophilisierung von Speichel, der vorher durch Ultrafiltration weniger stark konzentriert worden war.

Elektrophorese

Freie Elektrophorese (Apparatur nach ANTWEILER, 80 V, 40 min, MICHAELIS-Puffer pH 8.6, Ionenstärke 0.1). Papierelektrophorese am Horizontalstreifen (Apparatur nach GRASSMANN UND HANNIG, 115 V, 14 Std. MICHAELIS-Puffer pH 8.6, Ionenstärke 0.075 bzw. 0.08, optimale Auftragsmenge 20–50 μ l).

Kontinuierliche Papierelektrophorese (Apparatur nach DURRUM, 400 V, DOLE-Puffer pH 8.6, Ionenstärke 0.03).

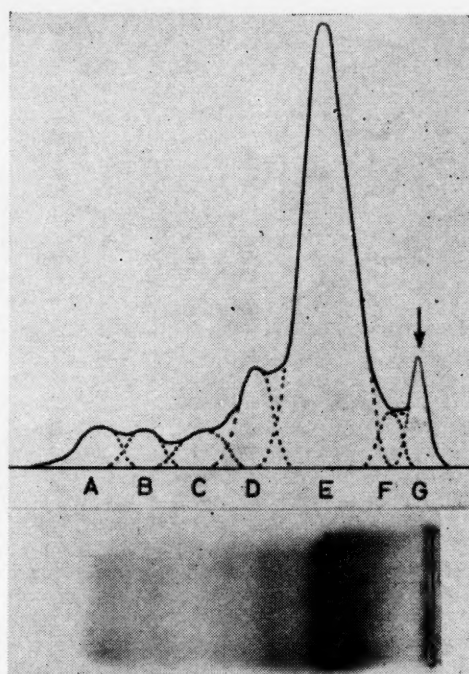


Fig. 1. Papierelektropherogramm von Mischspeichel (Amidoschwarzfärbung) und Extinktionskurve (Direktphotometrierung).

Färbemethoden

Proteine mit Amidoschwarz nach GRASSMANN UND HANNIG; Lipoproteide mit Sudanschwarz nach SWAHN; Glykoproteide nach BJÖRNESJÖ¹². Mucopolysaccharide mit Mucicarmin und Toluidinblau nach HAMERMAN¹³.

Amylasebestimmung

Stärke-Abklatschstreifen mit Jod-Spray; in den Eluaten der Horizontalstreifenabschnitte bzw. der kontinuierlichen Elektrophorese nach KING UND WOOTTON¹⁴.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Anlehnung an Untersuchungen von ZIPKIN *et al.*⁹ bzw. PATTON UND PIGMAN⁷ versuchten wir zunächst die Auftrennung des Speichels mittels freier Elektrophorese. Unsere Ergebnisse stimmten im wesentlichen mit jenen der Literatur überein und liessen 5 Fraktionen erkennen.

Die Papierelektrophoretische Auftrennung und Anfärbung mit Amidoschwarz lieferte gut reproduzierbar 5–7 Fraktionen. Unter den gegebenen Bedingungen wanderten 6 Fraktionen anodisch, die 7. blieb unbeweglich an der Auftragsstelle. Kathodisch wandernde Fraktionen konnten wir im Gegensatz zu anderen Untersuchern^{2, 5, 8} nicht sicher feststellen. Wir haben im Hinblick auf eventuell später notwendige weitere Unterteilung diese Fraktionen vorläufig mit den Buchstaben A bis G bezeichnet, wobei A die schnellste Komponente darstellt (Fig. 1). Die Benennung der Fraktionen nach den jeweils annähernd gleich schnellen Serumfraktionen, wie dies RAUCH UND KÖSTLIN⁸ vorschlagen, halten wir aus prinzipiellen Erwägungen für unzumessig.

Wir haben versucht, eine vorläufige Charakterisierung der einzelnen Fraktionen an Hand ihrer Beweglichkeit, der Färbbarkeit auf Glykoproteide, Lipoproteide und Mucopolysaccharide sowie der Lokalisierung der Amylase zu erreichen. In den einzelnen Fraktionen ergibt sich dabei folgendes Bild (Fig. 2):

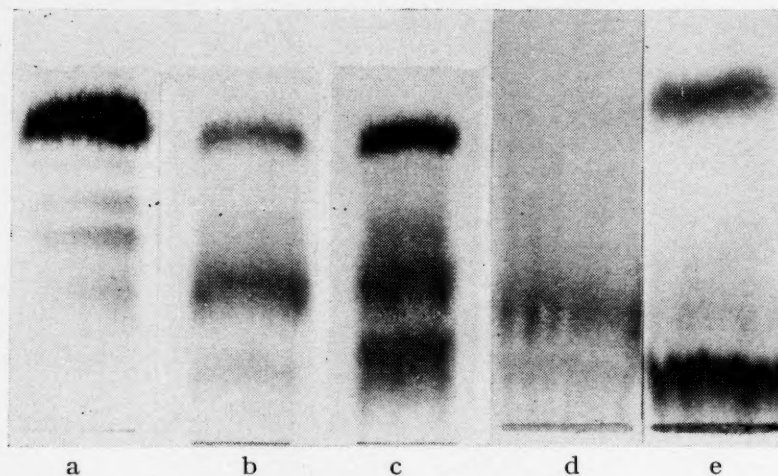


Fig. 2. a Normalserum, b, c und e Mischspeichel von verschiedenen Normalpersonen (Eiweissfärbung mit Amidoschwarz); d Glykoproteidfärbung zu e.

Fraktion A: Sie ist der Beweglichkeit nach mit Albumin identisch, wie ein Versuch mit zugesetztem Reinalbumin zeigte. Dies stimmt mit den Angaben von RAUCH UND KÖSTLIN⁸ überein, ebenso mit dem Befund von KINERSLY UND LEITE⁵, dass zugesetztes Bromphenolblau ausschliesslich von der schnellsten anodischen Speichelkomponente gebunden wird. Auch die nur schwache Anfärbung der A-Fraktion im Glykoproteidbild selbst bei sehr starker Auftragung steht damit in Einklang. Die relative Konzentration dieser Komponente ist im Mischspeichel sehr unterschiedlich, RAUCH UND KÖSTLIN⁸ konnten diesen Anteil nur im Submandibularisspeichel, nicht aber im Parotisspeichel nachweisen.

Fraktion B: Im Proteinbild sehr schwach, nicht immer von A unterscheidbar, in der PAS-Färbung Verhalten wie A (nur ausnahmsweise anfärbbar).

Fraktion C: Sehr schwache Proteinanfärbung, relativ zur geringen Eiweissmenge jedoch stärkere PAS-Reaktion.

Fraktion D: Beweglichkeit etwas geringer als zugesetztes reines β_1 -Globulin (Behring-Werke). Amidoschwarzfärbung deutlich, aber in der Intensität wechselnd. Immer weitaus stärkste PAS-Reaktion. D ist die einzige bewegliche Fraktion, welche regelmässig eine schwache positive Mucicarminfärbung gibt, sie färbt sich jedoch mit Toluidinblau nur orthochromatisch.

Fraktion E: Im allgemeinen stärkste Anfärbung mit Amidoschwarz. Schwache, aber immer sichtbare PAS-Färbung. Mit Mucicarmin deutlich heller als der Papieruntergrund. (Abdeckung durch Protein?)

Fraktion F: Kleine, unsichere Fraktion zwischen der Auftragsstelle und Fraktion E, möglicherweise Schleppe von E.

Fraktion G: Das regelmässig an der Auftragsstelle unbeweglich verbleibende Material möchten wir vorläufig als eigene Fraktion ansehen, da es nicht nur deutlich Amidoschwarz-, PAS- und Mucicarminfärbung zeigt, sondern als einzige Fraktion mit Toluidinblau die für saure Mucopolysaccharide geforderte Metachromasie aufweist. Diese Komponente enthält also als einzige neben Proteinen und Glykoproteiden

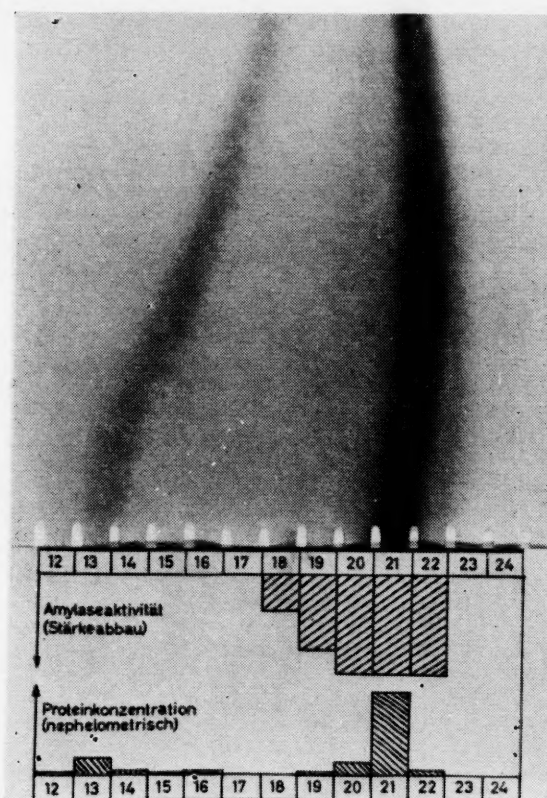


Fig. 3. Oben: Trennbogen einer kontinuierlichen Elektrophorese von Mischspeichel (Amidoschwarzfärbung). Unten: Diagramm der Amylaseaktivität bzw. Proteinkonzentration in den entsprechenden Sammelröhrchen (schnellste Fraktion in No. 13).

auch saure Mucopolysaccharide. Es handelt sich dabei anscheinend nicht um unlösliche Bestandteile des Speichels, da sich das beim Zentrifugieren gewonnene Sediment des Mischspeichels mit Toluidinblau nur orthochromatisch anfärbt.

Lipoproteide konnten in keiner Fraktion mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Amylase: Das Maximum der Amylaseaktivität zeigen relativ und absolut unsere Fraktionen E und F, aber auch D enthält noch geringere Mengen des Fermentes wie alle drei durchgeführten Nachweisarten erkennen lassen. Das mittels kontinuierlicher Elektrophorese gewonnene Ergebnis – unseres Wissens der erste solche Versuch mit Speichel – beweist, dass die Amylaseaktivität der langsameren Komponenten E und F nicht durch Schleppenbildung von D bedingt sein kann (Fig. 3).

Schliesslich wurde auch versucht, aus Mischspeichel Mucin rein darzustellen. Dieses wird allgemein als quantitativ grösste Eiweissfraktion des Speichels angesehen und als Glykoprotein, nach BLIX¹⁵ genauer als Sialoprotein, definiert. Ein Versuch, die klassische Fällungsmethode von HAMMARSTEN¹⁶ von wässrigem Submandibularisextrakt auf Speichel zu übertragen, blieb erfolglos. Nach der Methode von HAWK, OSER UND SUMMERSON¹⁷ mit Alkohol gefälltes Mucin erwies sich elektrophoretisch als nicht einheitlich, sondern enthielt die Speichelfractionen A, D und E, welche ihr typisches Verhalten in Beweglichkeit sowie Anfärbbarkeit zeigten.

Abschliessend sei kurz die Frage diskutiert, wie weit eine nähere Charakterisierung der Speichelproteine für das bessere Verständnis der Pathologie des Eiweissstoffwechsels von Wert sein kann. Bei einer Reihe von Myelomfällen wurde von uns neben Serum, Harn und Liquor auch das Eiweissbild des Speichels papierelektrophoretisch untersucht. Elektrophoretische Speichelbefunde bei Plasmocytom liegen u.W. bisher nicht vor. Auch bei vorsichtiger Beurteilung glauben wir an Hand der von uns bisher untersuchten Fälle sagen zu können, dass die Patienten mit deutlicher Paraproteinurie auch die Myelomfraktion im Speichel aufweisen, während dies bei ausschliesslichem Auftreten der Paraproteine im Serum nicht der Fall zu sein scheint. Ein hierfür typisches Bild zeigt Fig. 4.

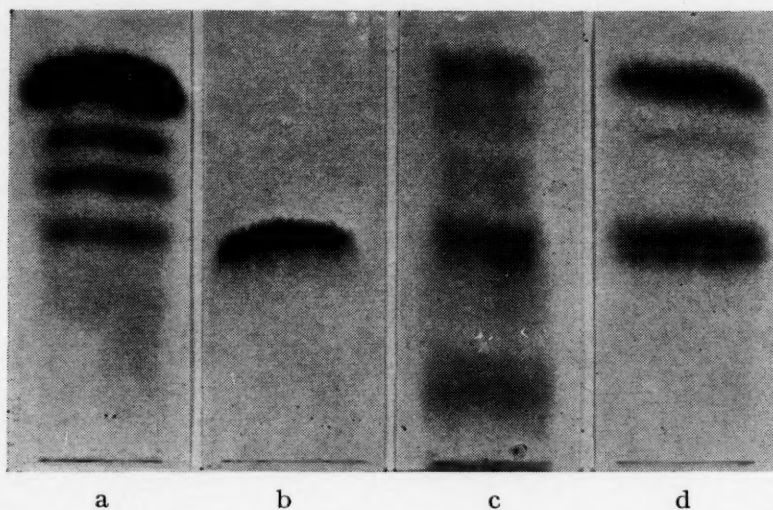


Fig. 4. Patientin V. S. Diffuses β -Plasmocytom (bestätigt durch Sternalpunktion). a Serum, b Harn, c Speichel, d Liquor.

ZUSAMMENFASSUNG

Menschlicher Mischspeichel wurde nach Konzentrierung der Proteine mittels Ultrafiltration bzw. Lyophilisierung in freier, Horizontalstreifen- und kontinuierlicher Elektrophorese untersucht. Es wurden 5–7 reproduzierbare Fraktionen gefunden, welche durch ihre Beweglichkeit, verglichen mit zugesetzten reinen Serumproteinfraktionen, ihre Anfärbbarkeit mit Amidoschwarz, mit der Perjodat-Schiff-Reaktion, mit Sudanschwarz, Mucicarmin und Toluidinblau charakterisiert wurden. Die Amylaseaktivität wurde am Horizontalstreifen und nach kontinuierlicher Elektrophorese lokalisiert. Alkoholgefälltes Mucin aus Mischspeichel erwies sich elektrophoretisch als uneinheitlich. Bei Myelomfällen mit Paraproteinurie konnte eine entsprechende Eiweissfraktion im Speichel nachgewiesen werden.

SUMMARY

CHARACTERISATION OF PROTEINS IN SALIVA

The proteins contained in mixed human saliva were concentrated by ultra-filtration or lyophilization and were subjected to electrophoreses, using boundary and zone separation and continuous paper electrophoresis. On horizontal paper strips 5-7 reproducible fractions were found, which were characterized by their respective mobilities as compared with pure serum protein fractions added, and by their staining with Amido Black, with the periodate-Schiff reaction, with Sudan Black, Mucicarmine and Toluidine Blue. The amylase activity was located on the horizontal strip and after continuous electrophoresis. Alcohol-precipitated mucin from mixed saliva appeared to be inhomogeneous upon electrophoresis. In patients with myeloma and paraproteinuria, a corresponding protein fraction was demonstrable in the saliva.

LITERATUR

- ¹ K. BRASS, *Frankfurt. Z. Pathol.*, 58 (1943) 56.
- ² R. CARTA UND R. CAMBA, *Rass. med. sarda*, 56 (1954) 135.
- ³ P. CASELLI UND H. SCHUMACHER, *Klin. Monatsbl. Augenheilk.*, 124 (1954) 148.
- ⁴ T. KINERSLY, *Yale J. Biol. Med.*, 26 (1953) 211.
- ⁵ T. KINERSLY UND H. B. LEITE, *Yale J. Biol. Med.*, 29 (1957) 496.
- ⁶ J. R. PATTON, *Thesis*, Univ. of Alabama, 1956.
- ⁷ J. R. PATTON UND W. PIGMAN, *Science*, 125 (1957) 1292.
- ⁸ S. RAUCH UND A. KÖSTLIN, *Schweiz. med. Wochschr.*, 87 (1957) 1371; *Helv. Med. Acta*, 24 (1957) 600.
- ⁹ I. ZIPKIN, E. R. ADAMIK UND H. A. SAROFF, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 95 (1957) 69.
- ¹⁰ K. HINSBERG UND G. SCHMID, in HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, *Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse*, Bd. V, 10. Aufl., Springer, Berlin, 1953, S. 357-362.
- ¹¹ F. W. KRZYWANIEK UND B. FLASCHENTRÄGER, in B. FLASCHENTRÄGER UND E. LEHNARTZ, *Physiologische Chemie*, Bd. II/1a, Springer, Berlin, 1954, S. 10.
- ¹² K. B. BJÖRNESJÖ, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 7 (1955) 153.
- ¹³ D. HAMERMAN, *Science*, 122 (1955) 924.
- ¹⁴ E. J. KING UND I. D. P. WOOTTON, *Micro-Analysis in Medical Biochemistry*, 3. Aufl., Churchill, London, 1956, S. 91.
- ¹⁵ G. BLIX, in B. FLASCHENTRÄGER UND E. LEHNARTZ, *Physiologische Chemie*, Bd. I, Springer, Berlin, 1951, S. 761.
- ¹⁶ O. HAMMARSTEN, *Z. physiol. Chem.*, 12 (1888) 163.
- ¹⁷ PH. HAWK, B. OSER UND W. SUMMERSON, *Practical Physiological Chemistry*, 13. Aufl., Churchill, London, 1954, S. 356.

SUR L'EXISTENCE D'UNE RELATION ENTRE LE TAUX DES γ -GLOBULINES SÉRIQUES ET LE NOMBRE DES PLASMOCYTES MÉDULLAIRES CHEZ LES NOIRS AFRICAINS

E. VAN OYE, G. VAN ROS ET P. CHARLES

Institut de Médecine Tropicale "Princesse Astrid", Léopoldville (Congo Belge)

La plupart des documents cliniques et expérimentaux que l'on peut actuellement réunir sur l'origine cellulaire des anticorps plaident en faveur de la production plasmocytaire de ces globulines. (MATHÉ ET BERNARD¹).

INTRODUCTION

Il est un fait connu que la quasi totalité des Noirs africains présentent un taux de plasmocytes médullaires plus élevé que celui des Européens d'âge correspondant². Des concentrations en γ -globulines plus fortes que chez les Européens sont également régulièrement constatées chez les Noirs³. Il nous a semblé intéressant de rechercher si, et dans quelle mesure, il existe un rapport entre ces deux phénomènes, la réponse à cette question pouvant jeter une certaine lumière et sur l'hyperplasmocytose et sur l'hyper-gammaglobulinémie.

A notre connaissance, la littérature ne renseigne rien à ce sujet en ce qui concerne les Noirs, et quelques rares publications seulement ont abordé cette question chez les Blancs*. JARROLD ET VILTER⁴ ont étudié 30 malades souffrant d'une insuffisance hépatique chronique et ont observé une telle corrélation entre la plasmocytose et la globulinémie que, selon eux, elle suggère l'existence d'une relation de cause à effet entre les deux. WEISE ET LOHSE⁵ ont constaté qu'une augmentation du nombre des plasmocytes est toujours accompagnée d'une augmentation du taux des γ -globulines. Par contre, il ne leur a pas été possible de découvrir un rapport quelconque entre les plasmocytes et les autres protéines sériques. Ces auteurs pensent que leurs résultats démontrent que les γ -globulines sont secrétées par les plasmocytes. MIYOSHI⁶ observe une corrélation très étroite entre la plasmocytose médullaire et les γ -globulines sériques, mais n'en trouve aucune entre ces protéines et les autres constituants cellulaires de la moelle osseuse.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons choisi pour ce travail des indigènes adultes chez qui nous avons constaté un taux plus ou moins élevé des γ -globulines, sans chercher à approfondir la raison de cet état de choses. Cette façon d'agir résulte de deux considérations: il est pratiquement impossible d'opérer une sélection rigoureuse des indigènes africains suivant les cas pathologiques, car ils ne souffrent pour ainsi dire jamais d'une seule maladie bien définie, mais d'un nombre plus ou moins grand d'affections plus ou moins importantes. D'autre part, l'utilisation de sujets présentant une seule affection

* Nous n'ignorons pas qu'il existe une abondante littérature qui traite du rapport entre les plasmocytes et les γ -globulines dans le domaine de l'immunologie. En faire mention ici nous obligerait à déborder largement le cadre de ce travail sans pour cela apporter des renseignements utiles à la compréhension du problème.

bien déterminée aurait pu introduire un facteur particulier à cette affection susceptible d'influencer les résultats de façon systématique.

Au total, nous avons examiné 39 cas. Trois d'entre-eux présentaient une plasmocytose avec anomalies cytologiques manifestes, et nous les avons éliminés pour ne pas fausser nos résultats. Ceux-ci se basent donc en fin de compte sur 36 cas.

Chez ces 36 cas nous avons déterminé le taux des protéines totales par une réaction colorimétrique au biuret suivant WEICHSELBAUM⁷. Les γ -globulines ont été séparées des autres fractions par électrophorèse sur papier. Ces fractions ont été colorées à l'Amido-Schwarz 10.B, la décoloration étant réalisée à chaud suivant une méthode inspirée de celle de DREVON⁸. Les déterminations colorimétriques directes sur les bandes de papier ont été effectuées au moyen d'un photomètre à inscription automatique des courbes d'électrophorèse, la mesure des surfaces étant réalisée simultanément par cet appareil (Analytrol, marque Spinco).

Ensuite, nous avons pratiqué une ponction sternale et déterminé le pourcentage des plasmocytes par rapport aux globules blancs. Ces déterminations ont été faites en

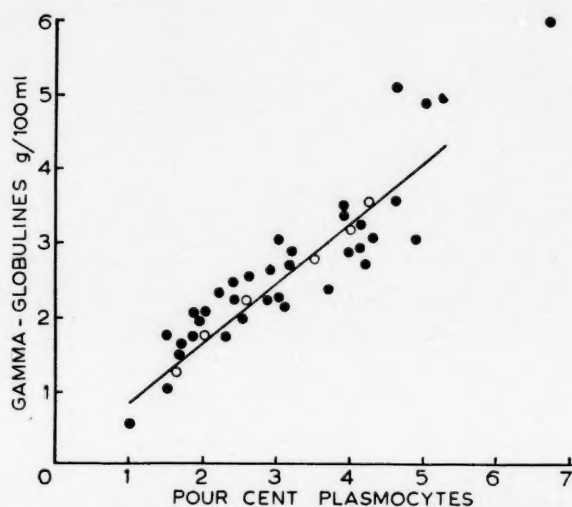


Fig. 1. Légende: o = moyennes, • = cas individuels.

double, par deux personnes différentes, et sur deux frottis différents, et chaque fois nous avons compté 1000 leucocytes. Quand il y avait une différence à notre avis marquée entre les résultats, le travail fut repris sur deux nouveaux frottis. Dans l'ensemble, les chiffres concordaient d'une façon remarquable, ce qui est dû notamment au fait que la dispersion des plasmocytes dans le suc médullaire est bien homogène.

RÉSULTATS

Le lecteur trouvera les détails de nos résultats exposés dans le Tableau I et représentés dans la Fig. 1. Les moyennes ont été calculées sur des groupes de cas comprenant tous les sujets dont le taux en γ -globulines était inclus entre des intervalles de classes de 0.5 g%. Cette façon de grouper a évidemment quelque chose d'arbitraire, mais il en aurait forcément été ainsi pour n'importe quelle façon de procéder. Cela ne peut d'ailleurs en rien diminuer la valeur réelle de nos résultats qui s'exprime clairement à la vue du graphique. Le résultat global s'y lit avec la même clarté: *il existe une relation linéaire entre le taux des γ -globulines et le taux des plasmocytes médullaires.*

TABLEAU I
RAPPORT ENTRE LA γ -GLOBULINÉMIE ET LA PLASMOCYTOSE MÉDULLAIRE CHEZ 36 AFRICAINS

<i>γ-globulines en g/100 ml</i>	<i>Moyennes des γ-globulines</i>	<i>% plasmocytes</i>	<i>Moyennes des plasmocytes</i>
0.55		1.0	
1.02		1.5	
1.50	1.26	1.7	1.6
1.57		1.7	
1.75		1.5	
1.75		2.0	
1.76		2.3	
2.00	1.76	2.5	2.0
2.05		1.9	
2.07		1.9	
2.12		1.9	
2.15		3.1	
2.20		3.7	
2.23		2.5	
2.25		2.9	
2.25		3.0	
2.32		2.2	
2.50	2.21	2.4	2.5
2.58		2.6	
2.66		2.9	
2.70		3.2	
2.75		4.2	
2.90		4.0	
2.92		3.2	
2.95	2.78	4.1	3.5
3.05		3.0	
3.05		4.9	
3.10		4.3	
3.25		4.1	
3.39	3.17	3.9	4.0
3.55		3.9	
3.57	3.56	4.5	4.2
4.90		5.0	
5.08		4.6	
5.22		5.3	
6.00		6.7	

DISCUSSION

Il nous paraît difficile d'accepter que cette relation soit fortuite et il faut sans doute y rechercher un rapport causal. Sans avoir la valeur démonstrative d'une expérimentation, elle est certainement en faveur d'une haute probabilité de la production par les plasmocytes, si pas de la totalité, du moins d'une grande partie des γ -globulines.

Une interprétation de cette relation serait sans doute aisée si la nature, la signification et le rôle des γ -globulines et des plasmocytes étaient établis. Mais il n'en est rien.

Bibliographie p. 71

En ce qui concerne les γ -globulines, on peut admettre comme étant prouvé qu'il existe un rapport étroit entre elles et les anticorps. Mais déjà ici deux thèses extrêmes s'affrontent. Selon la première, les γ -globulines seraient uniquement les vecteurs des anticorps mais en différencieraient totalement à tout autre point de vue. Selon la seconde thèse, des γ -globulines "normales" n'existeraient pas, toutes seraient par définition des immunisines.

En ce qui concerne les plasmocytes, nous devons mentionner également deux thèses extrêmes. Il y a celle qui leur attribue un rôle uniquement de thésaurisation et il y a l'autre qui ne voit dans les plasmocytes que des glandes sécrétrices unicellulaires.

Les résultats exposés dans nos premiers travaux⁹ nous ont convaincus que le taux élevé des γ -globulines sériques observé chez la plupart des Noirs est en premier lieu la conséquence de l'état de parasitisme chronique et multiple dont ceux-ci souffrent dès leur plus jeune enfance. Il est possible que l'hyper- γ -globulinémie soit également une conséquence, du moins partiellement, d'un état chronique de malnutrition ainsi que de dysfonction hépatique. Mais le rôle principal est certainement joué par les réactions de défense de l'organisme, et le rapport entre les γ -globulines et les immunisines doit certainement être très étroit.

Si, comme le présent travail tend, parmi d'autres, à le démontrer, les plasmocytes sont bien le siège principal des γ -globulines et si ces dernières sont réellement des immunisines, il devient dès lors nécessaire d'envisager la possibilité d'une pénétration des antigènes à l'intérieur des éléments plasmocytaires. Le mécanisme de cette pénétration, ainsi que les facteurs influençant son intensité mériteraient dès lors d'être étudiés. Ceci serait notamment possible en cultures de tissus où des antigènes marqués pourraient être mis en présence de ces cellules sécrétrices.

RÉSUMÉ

RELATION BETWEEN THE SERUM γ -GLOBULIN CONTENT AND THE NUMBER OF BONE-MARROW PLASMOCYTES IN AFRICAN NEGROES

Les auteurs ont procédé, chez 36 africains, à un dosage du taux des γ -globulines sériques et à une détermination du pourcentage des plasmocytes médullaires. Ils ont observé une relation linéaire entre ces deux données. Ils en concluent que, si pas la totalité, du moins une grande partie des γ -globulines est synthétisée par les plasmocytes.

SUMMARY

The authors determined the serum γ -globulin levels and the percentage of bone-marrow plasmocytes in 36 African negroes. They noticed a linear relationship between these two data. They conclude that a large proportion, if not all, of the γ -globulins are synthesized by the plasmocytes.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ G. MATHÉ ET J. BERNARD, *Rev. hématol.*, 12 (1957) 529.
- ² I. BLITSTEIN, *Ann. soc. belge méd. trop.*, 30 (1950) 1401.
- ³ E. VAN OYE ET P. CHARLES, *Ann. soc. belge méd. trop.*, 37 (1957) 955.
- ⁴ TH. JARROLD ET R. W. VILTER, *J. Clin. Invest.*, 28 (1949) 286.
- ⁵ H. WEISE ET H. LOHSE, *Blut*, 2 (1956) 108.
- ⁶ K. MIYOSHI, *V. Kongr. Europ. Ges. Hämatol.*, Springer Verlag, Berlin, 1956.
- ⁷ T. E. WEICHSSELBAUM, *Am. J. Clin. Pathol.*, 16 (1946), Techn. Sect. 40.
- ⁸ B. DREVON, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 321.
- ⁹ E. VAN OYE ET P. CHARLES, *Ann. soc. belge méd. trop.*, 31 (1951) 387.

ÉTUDES SUR LES PROTÉINES DU LIQUIDE CEPHALO-RACHIDIEN

PIERRE BURTIN

avec l'aide technique de Mme J. URIEL
Institut Pasteur et Hôpital Saint-Antoine, Paris (France)

I. DOSAGE DES PROTÉINES DU L.C.R.

Ce chapitre groupe deux ordres de recherches, les unes portant sur le dosage des protéines totales, les autres sur l'estimation quantitative des γ -globulines.

Les méthodes

Dosage des protéines totales

Les méthodes habituellement utilisées en France sont empiriques et de valeur médiocre. Dans l'espoir d'en trouver une meilleure, j'ai étudié la méthode du biuret dans ses différentes variantes.

J'ai utilisé deux formules de réactifs: celle donnée par GORNALL *et al.*¹, et celle de DITTERBRANDT² (d'après WEICHSELBAUM).

Chacun de ces biurets a été employé de deux manières: (a) addition directe de 4 ml de biuret à 1 ml de L.C.R., et (b) précipitation de 2 ml de L.C.R. par un égal volume d'acide trichloracétique à 20%, centrifugation, redissolution du précipité dans 5 ml de biuret.

Après une attente de 30 min, la température étant maintenue à 25°, les colorations ont été appréciées au photomètre Zeiss Elko II avec un filtre ayant un maximum d'absorption à 546 m μ .

Ces mesures ont été faites sur 64 L.C.R. ou mélanges de L.C.R. Les chiffres obtenus ont été comparés à ceux donnés, pour les mêmes liquides, par la technique de SICARD-CANTALOUBE³, par la néphélométrie selon MESTREZAT⁴, par le dosage d'azote par micro-Kjeldahl effectué sur précipité trichloracétique: cette dernière méthode servait de référence.

Dosage immunochimique des γ -globulines

Le principe de la méthode consiste à apprécier l'importance du précipité spécifique formé par une quantité fixe d'immunsérum et l'antigène à étudier. Dans un premier temps, l'immunsérum a été étalonné avec des quantités progressives d'antigène, ici les γ -globulines. KABAT⁵ appréciait l'importance du précipité par dosage selon la méthode de HEIDELBERGER ET KENDALL. J'ai utilisé l'opacimétrie¹⁴.

Dans des tubes à hémolyse, on met 0.25 ml d'immunsérum anti- γ -globulines, 0.50 ml de L.C.R. et 1.25 ml de solution saline à 8.5 ‰. Après mélange soigneux, on incube les tubes 10 min à 25° on lit l'opacité obtenue au photomètre Zeiss Elko II.

Les résultats sont bons si la température et le temps d'incubation sont strictement comparables, et si l'on fait des contrôles des immunsérums avec des solutions fraîchement diluées de γ -globulines (100 μ g/ml).

Résultats

Dosage des protéines totales

La comparaison des différentes méthodes, avec le dosage d'azote comme référence montre que: (a) la méthode de SICARD-CANTALOUBE donne des chiffres trop faibles et très dispersés; (b) la néphélométrie fournit des valeurs trop hautes mais beaucoup moins dispersées; (c) en ce qui concerne l'utilisation du biuret, le meilleur procédé s'est révélé être l'emploi du reactif de GORNALL après précipitation trichloracétique. C'est ainsi qu'on obtient des chiffres les plus proches de ceux fournis par la méthode de référence et les moins dispersés (pour plus de détails, voir BURTIN *et al.*⁶).

Avec cette méthode, les protéines totales varient dans d'assez grandes proportions et l'on doit admettre des chiffres allant de 0.15 à 0.40 mg/ml.

Deux remarques sont à faire: (1) la faible quantité de ces protéines force à travailler avec des colorations faibles. C'est dire la nécessité d'un excellent photomètre; (2) si l'on n'emploie pas de précipitation trichloracétique, le biuret dose les polypeptides en même temps que les protéines, d'où la nécessité d'une correction. Mais celle-ci déterminée expérimentalement varie selon la formule du biuret utilisé. C'est dire qu'un éventuel dosage des polypeptides basé sur cette méthode nécessiterait un étalonnage préalable rigoureux.

Dosage des γ -globulines

La méthode opacimétrique permet de considérer comme normaux des chiffres de γ -globulines allant de 20 à 40 μ g/ml (KABAT⁵ trouvait comme valeurs normales de 17 à 36 μ g/ml).

La marge de sensibilité de la méthode va de 10 à 60 μ g de γ -globulines. C'est dire que l'application directe au L.C.R. en est facile. C'est seulement dans les cas très anormaux qu'il est nécessaire de diluer les L.C.R.

Le rapport γ -globulines/protéines totales du L.C.R. est de 5 à 10%, en conformité avec les résultats de l'électrophorèse sur papier. Il y a donc proportionnellement moins de γ -globulines dans le L.C.R. que dans le sérum.

Dans les cas pathologiques, les γ -globulines subissent des variations. Ce sont surtout les L.C.R. des maladies mentales qui ont été étudiés⁷. C'est ainsi que le taux de γ -globulines du L.C.R. est normal dans les psychoses maniaco-dépressives et la plupart des schizophrénies. Il augmente dans les délires chroniques, dans les démences évolutives et dans les états confusionnels récents. Il est toujours anormal dans les syphilis nerveuses.

II. ÉTUDES IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUES

Ce travail a eu pour double but: de comparer les méthodes de concentration du L.C.R. d'en dénombrer les constituants et de les identifier par rapport à ceux du sérum humain normal.

Matériel et méthodes

Matériel

J'ai utilisé six mélanges de L.C.R., chacun au moins égal à 100 ml. L'un (N) groupait des liquides normaux, les 5 autres (numérotés de P₁ à P₅) des L.C.R. prélevés chez des malades mentaux, avant tout des schizophrènes.

Les protéines totales de ces 6 mélanges ont été dosées par la méthode du biuret

comme décrit plus haut: dans tous les cas, elles étaient aux environs de 0.30 mg/ml, sauf pour P₅ où elles atteignaient 0.60 mg/ml.

Méthodes

a) *Concentration*. Nous avons utilisé:

(1) L'ultrafiltration, avec un appareil Membranfilter MD 35-10, l'opération étant conduite pendant 18 h sous une pression de 9 atm. d'azote. Puis le peu de liquide surnageant la membrane est aspiré avec une pipette Pasteur et déposé directement dans le réservoir de départ de la plaque d'électrophorèse.

(2) La lyophilisation, avec un appareil Usifroid, une quantité de L.C.R. amenant environ 1 mg de protéines étant mise dans chaque ampoule. La poudre obtenue est ensuite redissoute avec une micro-goutte d'eau distillée ou de tampon pour électrophorèse.

(3) La précipitation par l'acétone: à 5 ml de L.C.R. refroidi dans une saumure, on ajoute 45 ml d'acétone pure refroidie dans un mélange alcool-neige carbonique. Après mélange soigneux et attente de 15 min, on centrifuge à froid puis on décante et on laisse le précipité un certain temps à la température du laboratoire pour que l'acétone s'évapore. Puis on redissout avec une microgoutte d'eau distillée ou de tampon pour électrophorèse.

(4) La précipitation par l'acétate de cuivre (technique de URIEL⁸): le L.C.R. est dialysé contre une solution d'acétate de cuivre à $16 \cdot 10^{-4}$ M, dans de l'acétate de sodium 0.03 M, pendant 3 h à 37°. Le précipité centrifugé est dissous par une microgoutte de solution neutralisée M/6 de complexon III.

Dans tous les cas, les L.C.R. ont été préalablement dialysés pendant 2 jours contre de l'eau distillée neutre changée au bout de 24 h. Seuls les L.C.R. destinés à l'ultrafiltration n'ont été dialysés que 24 h.

b) *Analyse immuno-électrophorétique*. La technique a été celle de GRABAR ET WILLIAMS⁹, en utilisant des plaques de 9×12 cm, une durée d'électrophorèse de $1\frac{3}{4}$ h, avec une différence de potentiel de 5 à 6 V/cm.

Parmi les immunsérums essayés, le meilleur s'est révélé être l'immunsérum de mulet antisérum humain normal No. 282. Il a été employé tel quel, ou dilué de moitié, ou absorbé par diverses protéines: sérumalbumine, protéines solubles dans l'acide trichloracétique (essentiellement seromucoïde acide) haptoglobine, sidérophiline. D'autres immunsérums antisérum humain normal sont nettement moins bons: l'immunsérum de cheval No. 1299 en particulier ne révèle que très peu de protéines du L.C.R. Certains immunsérums spécifiques se sont montrés par contre très utiles, en particulier un immunsérum de lapin anti-sidérophiline.

Les réactions de précipitation terminées (habituellement au bout de trois jours), les plaques ont été mises à laver puis desséchées enfin colorées par l'azocarmin¹⁰. Nous avons aussi utilisé la détection enzymatique de la céruloplasmine selon URIEL¹¹.

RÉSULTATS

Comparaison des méthodes

La lyophilisation, la précipitation par l'acétone et l'ultrafiltration donnent à peu de chose près les mêmes résultats. Il existe certes de petites différences mais qui sont

sans doute dues au fait qu'il est impossible de mettre exactement la même quantité de protéines à migrer d'une expérience à une autre.

Fig. 1



Fig. 2

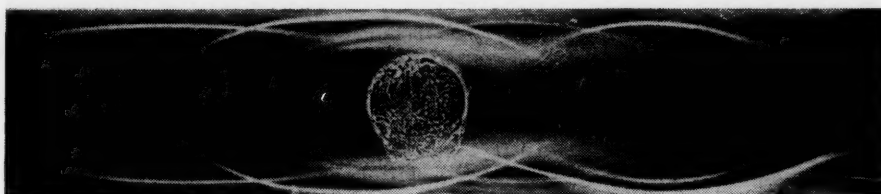


Fig. 3

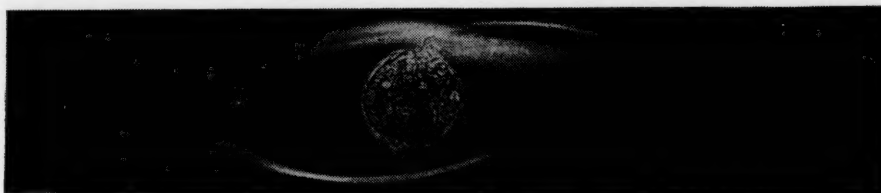


Fig. 1. Analyse immuno-électrophorétique du sérum humain normal, révélé en haut par l'immunsérum de mulet anti-sérum humain normal No. 282, en bas par le même immunsérum absorbé par la sérumalbumine.

Fig. 2. Analyse immuno-électrophorétique du liquide céphalo-rachidien concentré par lyophilisation (mélange P₁), révélé par l'immunsérum No. 282, entier en bas, en haut absorbé par la sérumalbumine.

Fig. 3. Analyse immuno-électrophorétique du même liquide céphalo-rachidien, révélé en haut par l'immunsérum No. 282 absorbé par les protéines d'une urine normale (protéinurie physiologique), en bas par un immunsérum de lapin antisidérophiline.

La précipitation par l'acétate de cuivre s'est par contre montrée moins efficace: les résultats en sont un peu irréguliers, et il semble que certaines α -globulines ne soient pas précipitées.

Dénombrement des constituants

Le mélange N et les mélanges P₁, P₂, P₃ et P₄ donnent à peu près le même diagramme électrophorétique. Par ordre de mobilité croissante, on note (Fig. 2) la présence de traits de précipitation correspondant aux γ -globulines, à une forte β -globuline, et à une peu importante, à 2 ou 3 α_2 -, à une α_1 - assez faible, à la sérumalbumine, au séromucoïde acide (constituant X). La protéine ρ (préalbumine) n'a pu être étudiée, faute d'immunsérums la révélant bien. Il n'y a pas, dans ces conditions de β_2 -globulines décelables, ce qui n'exclut pas leur présence en toute petite quantité.

Il y a cependant de petites différences entre ces mélanges de L.C.R.: c'est ainsi que le mélange N contient une α_1 -globuline forte, que dans P₁ la deuxième β_1 -globuline est plus importante et qu'on distingue faiblement le trait de précipitation d'une β_2 -globuline, que dans P₃ les α_2 -globulines sont proportionnellement augmentées.

Le mélange P_5 contient beaucoup plus de protéines diverses: outre les γ -globulines, on note une β_2 -globuline peu importante, deux β_1 -globulines dont l'une beaucoup plus considérable que l'autre, au moins trois α_2 -globulines, deux α_1 -, la sérumalbumine et le séromucoïde acide, enfin la ρ -lipoprotéine (cette protéine ne semble altérée ni par la lyophilisation, ni par la précipitation acétonique. Cependant en l'absence de coloration par le Soudan noir, on ne peut affirmer la conservation de sa teneur en lipides).

Identification des constituants

Grâce à l'emploi d'immunsérums spécifiques, ou absorbés spécifiquement, on a les identifications suivantes: (a) la principale β_1 -globuline est la sidérophiline (Fig. 3); (b) parmi les α_2 -globulines, il n'y a pas d'haptoglobine, sauf dans le mélange P_5 ; il n'y a pas d' α_2 -macroglobuline. Il ne semble pas y avoir de céruléoplasmine car la réaction colorée à la paraphénylènediamine est négative; d'autre part, il n'y a pas d' α_2 -globuline du L.C.R.: décelable par l'immunsérum de cheval 1299 qui a des anticorps précipitants anti-céruléoplasmine, et anti- α_2 -macroglobuline; (c) l' α_1 -globuline est probablement la même, que la principale α_1 -globuline sérique, qui a une constante de sédimentation de 3,5 S.

DISCUSSION

(1) Le L.C.R. normal a déjà été étudié grâce à l'analyse immunoélectrophorétique par des chercheurs travaillant sous la direction de GRABAR ET LEWIN, et utilisant des L.C.R. concentrés par ultrafiltration¹². Leurs diagrammes et les nôtres sont assez comparables. Cependant, ils avaient noté l'existence d'une β -globuline très importante donnant deux maximums de précipitation et qu'ils avaient considérée comme une β_2 -globuline. J'ai retrouvé quelques fois cet aspect à double courbure; le plus souvent ce trait de précipitation est un arc simple qui occupe toute la zone électrophorétique β et qui correspond certainement à la sidérophiline (la plus lente des β_1 -globulines sériques).

(2) La composition qualitative du L.C.R. est différente de celle du sérum humain normal. Elle varie d'autre part d'un L.C.R. à un autre pour une même teneur en protéines. Ceci est très important ne fût-ce que pour l'interprétation des électrophérogrammes sur papier du L.C.R. maintenant de plus en plus souvent obtenus. Par exemple, les β -globulines représentent un pourcentage important des protéines totales du L.C.R. (environ 20%). Mais elles n'ont pas la même signification que les β globulines sériques, puisque constituées pour une bonne part de sidérophiline. De plus, l'augmentation des globulines du L.C.R. peut être due ou non à l'apparition de nouveaux constituants. L'interprétation des électrophorèses sur papier du L.C.R. doit être faite jusqu'à nouvel ordre avec beaucoup de prudence.

Il est utile aussi de souligner l'absence ou le très faible taux des β_2 -globulines dans le L.C.R. Cette notion est utile à considérer lorsqu'on discute la validité du dosage immunochimique des γ -globulines du L.C.R., tel qu'il est exposé plus haut. Les immunsérums anti- γ -globulines contiennent presque toujours des anticorps contre les β_2 -globulines. Mais en l'absence d'antigènes correspondants, ces anticorps ne peuvent être gênants, et l'opacité obtenue correspond seulement aux γ -globulines (ceci ne s'applique peut être pas aux L.C.R. très pathologiques).

(3) La valeur possible de l'analyse immuno-électrophorétique pour l'étude des L.C.R. pathologiques est à l'heure actuelle difficile à affirmer. Certes, il y a des différences notables de composition qualitative selon les L.C.R., mais dans nos expériences, il s'agit de mélanges de L.C.R., ce qui diminue peut-être la valeur de nos résultats. C'est dire la nécessité d'études nouvelles.

Un problème connexe est l'existence possible de protéines propres au L.C.R. Seule l'étude d'immunsérums anti-L.C.R. permettra de résoudre cette question.

(4) L'origine du L.C.R. On discute de longue date pour savoir si le L.C.R. est un transsudat ou un produit de sécrétion. Les renseignements que donne l'analyse immuno-électrophorétique indiquent que le phénomène de transsudation ne peut être seul en cause: il ne saurait expliquer en particulier l'importance de la sidérophiline par rapport à la sérumalbumine ou d'autres protéines de poids moléculaire encore plus faibles, telle l' α_1 -globuline. Par contre, l'apparition de nouvelles protéines dans les cas pathologiques est peut-être liée à une transsudation supplémentaire.

Le problème est voisin de celui de la protéinurie physiologique qui a presque la même composition que les L.C.R. normaux¹³. Elle contient en effet, une quantité importante de sidérophiline. Cependant elle renferme un peu moins de protéines diverses que le L.C.R.: l'épuisement de l'immunsérum de mulet 282 par la protéinurie physiologique laisse subsister quelques anticorps contre des α_2 - et une β_1 -globuline, du L.C.R. comme le montre la Fig. 3.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier M. LANIÈCE pour le prêt de son appareil à ultrafiltration et pour les conseils qu'il m'a donnés. Je suis redevable au Prof. SCHULTZE d'un échantillon de sidérophiline, à Mlle de VAUX ST. CYR d'un extrait trichloracétique de sérum humain: je leur en suis très reconnaissant. Je remercie aussi MM. DEVELAY et BOCHER pour leur travail photographique.

RÉSUMÉ

Dans une première partie sont exposés les dosages des protéines totales et des γ -globulines du L.C.R. respectivement par la méthode du biuret et par une technique immunochimique. Puis, sont rapportées des études immuno-électrophorétiques sur les protéines du L.C.R., études qui permettent de comparer les méthodes de concentration du L.C.R., de dénombrer et parfois d'identifier ses constituants, enfin de discuter certains problèmes de physio-pathologie.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE PROTEINS OF THE CEREBRO-SPINAL FLUID

In the first part of this paper a description is given of the determination of total proteins and globulins in the cerebro-spinal fluid, by the biuret method and by an immunochemical method respectively. Immuno-electrophoretic studies of the proteins are then described. These studies made it possible to compare various methods of concentrating cerebrospinal fluid, as well as to distinguish and sometimes to identify the constituents. Certain physiopathological problems are also discussed.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. GORNALL, C. BARDAWILL ET M. DAVID, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 751.
- ² M. DITTERBRANDT, *Am. J. Clin. Pathol.*, 18 (1948) 439.
- ³ SICARD-CANTALOUBE in FIESSINGER, OLIVIER ET HERBAIN, *Les diagnostics biologiques*, Maloine, Paris, 1946.
- ⁴ W. MESTREZAT, *Compt. rend. soc. biol.*, 84 (1921) 382.
- ⁵ E. A. KABAT, M. GLUSMAN ET V. KNAUB, *Am. J. Méd.*, 4 (1948) 653.
- ⁶ P. BURTIN, D. DOUTRIAUX ET J. J. POCIDALO, *Presse méd.*, 66 (1958) 413.
- ⁷ P. MOLLARET, J. DELAY, P. BURTIN ET TH. LEMPERIÈRE, *Semaine hôp.*, 32 (1956) 1149.
- ⁸ J. URIEL (inédit).
- ⁹ P. GRABAR ET C. A. WILLIAMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193 et 17 (1955) 67.
- ¹⁰ J. URIEL ET P. GRABAR, *Ann. Inst. Pasteur*, 90 (1956) 427.
- ¹¹ J. URIEL, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 105.
- ¹² K. GAVRILESCO, J. COURCON, P. HILLION, J. URIEL ET P. GRABAR, *Bull. soc. chim. biol.*, 37 (1955) 803.
- ¹³ J. C. PATTE, *Rev. franç. études clin. biol.*, (à paraître).
- ¹⁴ P. BURTIN ET J. J. POCIDALO, *Presse méd.*, 62 (1954) 1072.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF DIFFERENT
HAPTOGLOBINS

C. B. LAURELL

Department of Clinical Chemistry, Malmö General Hospital, Malmö (Sweden)

As yet no methods have been available for isolating haptoglobins, the hemoglobin-binding α^2 -mucoproteins, from plasma. It is true that in 1954, JAYLE AND BOUSSIER¹ reported, that they had succeeded in purifying one type of haptoglobin from the urine derived from a patient with a nephrotic syndrom. As early as 1950 VAN ROYEN² had purified a complex between hemoglobin (Hb) and haptoglobin (Hp) from human and bovine plasma. His method was based on an early observation by JAYLE³ that Hp is less soluble in ammonium sulphate than the complex between Hb and Hp. In addition VAN ROYEN and JAYLE *et al.*^{3, 4} have presented evidence suggesting the existence of more than one type of Hp. The starch gel electrophoresis introduced by SMITHIES⁵ opened new possibilities for further development. With the aid of this technique it was possible to demonstrate the occurrence of three different types of Hp and that the type of Hp in a given subject is dictated by genetical factors. This technique is suitable for mass microanalysis.

The characteristic pattern of each type of Hp is most easily recognized if Hb is added to the serum before analysis, and if the gel is stained after the electrophoretic separation with a solution containing benzidine and hydrogen peroxide as proposed by GALATIUS-JENSEN⁶. However, if the Hp concentration is below normal, it may be difficult to decide to which type the individual belongs, since in conventional electrophoresis (pH 8.4) the unbound Hb has a higher mobility than all the complexes. The trailing of Hb may therefore mask faint HpHb bands. Classification can, however, be facilitated by performing the gel electrophoresis in a weak phosphate buffer at pH 7 or less, in which the free Hb migrates to the cathode and the HpHb complexes to the anode.

A high yield of purified Hp can only be obtained with the case of plasma from genetically pure population, since the different types of Hp show differences in solubility in both ammonium sulphate solutions as well as in dilute alcoholic solutions. Conventional pooled plasma is thus a poor starting material for the isolation of Hp. In this material each Hp type occurs in only a relatively low concentration.

We have used ascitic fluid as the source, for several reasons: it is cheap; many litres may be obtained from individual cases and, if patients having a high level of Hp were chosen, the ascitic fluid contained Hp in a much higher relative concentration than sera from healthy subjects.

The first purification step consists of fractionated ammonium sulphate precipitation. The salt range chosen is determined by the Hp type, the Hp concentration and with the aid of the solubility curves for the different Hp types (Fig. 1).

If the solution obtained after the salt precipitation is dialysed, the Hb-binding capacity often decreases considerably. Acetone precipitation in the cold was found to be a suitable second step. The saturated salt solution at the bottom and the super-

natant acetone-water solution at the top of the tubes after centrifugation could easily be decanted. The Hp was then eluted with dilute acetone in the cold from the protein cake. After reprecipitation the Hp was dissolved in saline. The solution could then be dialysed without any loss in activity.

The next step consists of fractionated precipitation at low ionic strength with ethanol in the cold. Finally, the salt fractionation is repeated. The endproducts are water soluble and have to be stored in the frozen state, since their typical pattern on gel electrophoresis gradually changes on prolonged storage above freezing point.

The paper-electrophoretic pattern of the different haptoglobins shows only one fraction. This monotonous picture is in contrast to that after gel electrophoresis (Fig. 2).

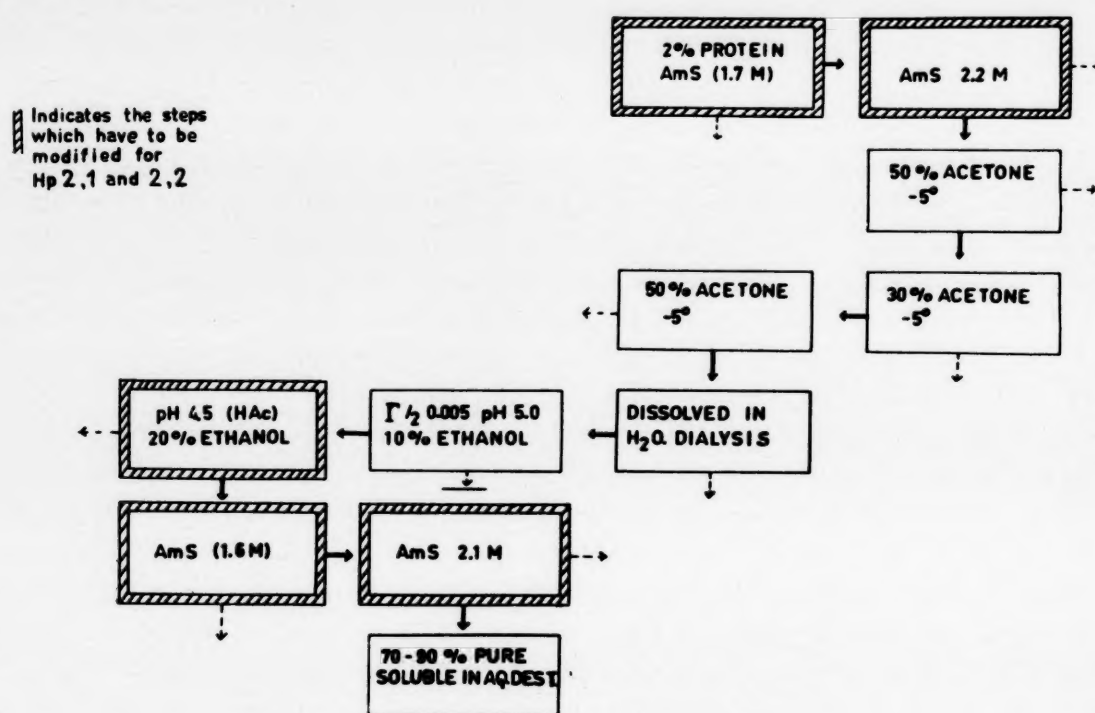


Fig. 1. Scheme for isolation of haptoglobin 1.1.

The Hp type 2.2 is obtained in high purity. Type 1.1 is usually contaminated with 10 to 20% of a component with higher mobility.

For final purification of this type of Hp, the preparative starch gel electrophoresis technique recently published by MORETTI *et al.*⁷ may be of value. The one proposed by SMITHIES⁵ was found to be unsuitable, since the product becomes contaminated with soluble starch.

The complexes between haptoglobin and hemoglobin may readily be isolated from partly purified solutions of the different haptoglobins, since these complexes are easily precipitated with small amounts of ethanol at low ionic strength pH 5.4. As a matter of fact, the complexes between Hp 2.2 and Hb are so insoluble at this pH, that they come out as a curious thin gel already on dialysis.

The physico-chemical data of the different haptoglobins are not yet ready but it may be mentioned that as preliminary ultracentrifugal studies showed, Hp 1.1 behaves like a single component with a sedimentation constant of 4.2 S, which is in accordance with the figure found by JAYLE *et al.*³ for their Hp isolated from urine.

The Hp belonging to group 1.2 was heterogenous (5.6 and 6.4 S) and group 2.2 gave a constant of 7.5 S.

JAYLE *et al.*³ have shown that one molecule of their pure Hp, apparently belonging to group 1.1, binds one molecule Hb. In spite of this, a surprising gel-electrophoretic pattern is obtained when Hp 1.1 has been enriched with increasing amounts of Hb (Fig. 3). On partial saturation with Hb an intermediary complex is formed, that cannot possibly correspond to a reaction one to one, if both the reacting molecules are monovalent. A similar phenomenon is observed, when this type of experiment is performed with the other haptoglobins. Experimental data suggest that the intermediary complex formed with Hp 1.1 consists of one molecule Hp and a half molecule Hb.



Fig. 2. Electrophoretic pattern (starch gel 8.4) of the different haptoglobins and their hemoglobin complexes.

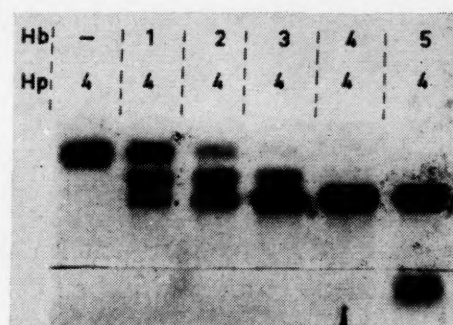


Fig. 3. Protein pattern obtained on starch gel electrophoresis (pH 6.9) of haptoglobin 1.1 when increasing amounts of hemoglobin has been added. 2-4 designates a half saturated Hp-solution, 4-4 a saturated, 5-4 a supersaturated.

SUMMARY

Pooled plasma is unsuitable as a source for isolating haptoglobin since such plasma contains a mixture of haptoglobins of the different types Hp 1.1, Hp 2.1 and Hp 2.2. Ascitic fluid from patients with increased serum concentration of haptoglobin has been found to be a suitable source. A scheme is presented showing how the different haptoglobins can be easily purified as hemoglobin-haptoglobin complexes based on the great difference in solubility between free haptoglobins and the haptoglobin-hemoglobin complexes. Fraction schemes have also been worked out for the isolation of the different haptoglobin in a free and stable form. Physico-chemical data on the different haptoglobins and their hemoglobin-complexes are presented.

REFERENCES

- ¹ M. F. JAYLE AND G. BOUSSIER, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 959.
- ² A. H. H. VAN ROYEN, *Dissertation*, Amsterdam, 1950, Drukkerij Waltman, Delft.
- ³ M. F. JAYLE AND G. BOUSSIER, *Exposés ann. biochim. méd.*, 17 (1955) 157.
- ⁴ M. F. JAYLE, *Bull. soc. chim. biol.*, 29 (1947) 149.
- ⁵ O. SMITHIES, *Biochem. J.*, 61 (1955) 629.
- ⁶ F. GALATIUS-JENSEN, *Acta Genet. et Statist. Med.*, 7 (1957) 549.
- ⁷ J. MORETTI, G. BOUSSIER AND M. F. JAYLE, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 59.

HAPTOGLOBIN UND ERYTHROKINETIK

MARGARETA NYMAN, K. GYDELL UND B. NOSSLIN

Zentrallaboratorium des Allgemeinen Krankenhauses, Malmö (Schweden)

Der Haptoglobinspiegel im Blut (Hp/s), normal zwischen 30 und 190 mg %¹, ist bei Krankheiten sehr grossen Variationen unterworfen. Erhöhte Werte (bis auf 1000 mg %) kommen bei allen Formen von inflammatorischen, degenerativen oder neoplastischen Prozessen vor, und sind also sehr häufig². Subnormale Haptoglobininwerte und Ahaptoglobinämie kommen dagegen seltener vor. In einem klinischen Material von ca. 2000 Fällen haben wir Ahaptoglobinämie (das heisst mit heutigen Methoden nicht nachweisbarer Haptoglobingehalt im Blut) bei 140 Patienten vorgefunden. 116 von diesen hatten eine Anämie, in 20 Fällen war die Diagnose Lebercirrhose. In den 4 übrigen Fällen konnte die Ätiologie des Haptoglobinemangels nicht festgestellt werden³. Da Patienten mit Anämie einen so grossen Teil der gesamten Ahaptoglobinämie Fälle ausmachen, haben wir untersucht wie sich der Haptoglobingehalt des Blutes bei verschiedenen Anämieformen zu anderen erythrokinetischen Daten verhält.

Als Mass des *gesamten Hämoglobinkatabolismus* wurden die Gallenfarbstoffe im Fäzes nach HEILMEYER UND KREBS⁴ sowie die Kohlenoxyd-Hb-Konzentration

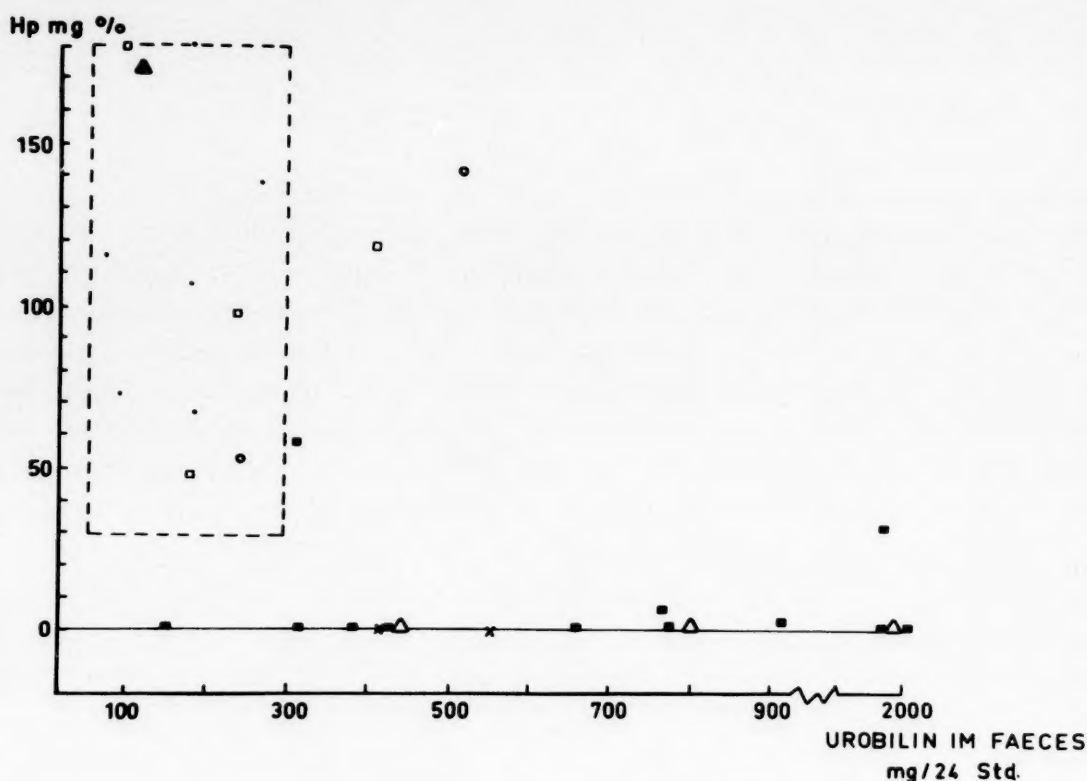


Fig. 1. Verhältnis zwischen Haptoglobin/s und Urobilin im Fäzes bei verschiedenen Anämieformen. Das gestrichelte Feld entspricht den Normalwerten. \triangle Kong. hämolytischer Ikterus; \blacktriangle Kong. hämolytischer Ikterus nach Splenektomie; \blacksquare Erworbene hämolytische Anämie; \square Erworbene hämolytische Anämie nach Remission; \circ Osteosklerotische Anämie; \times Perniziöse Anämie; \bullet Anämien unklarer Etiologie.

(% COHb) im Blut nach SJÖSTRAND⁵ quantitativ bestimmt. Die Grösse des metabolisierten *zirkulierenden Hämoglobins* wurde mit Hilfe der Bestimmung der Erythrocyten-Lebensdauer mit der ⁵¹Cr Methode geschätzt. Das Vorkommen von Methämalbumin – mit elektrophoretischer Methode dargestellt³ – wurde als Kriterium für *intra-vasale Hämolyse* genommen, und schliesslich wurde die Zahl der Reticulozyten per 1000 Erythrocyten als ein relativer Ausdruck für die Aktivität der *effektiven Erythropoese* angenommen. Haptoglobinbestimmungen wurden nach JAYLE ausgeführt⁶. Das Material besteht aus diagnostisch sicheren Fällen von verschiedenen Anämie-typen: sideropene Anämie, perniziöse Anämie, kongenitaler hämolytischer Ikterus,

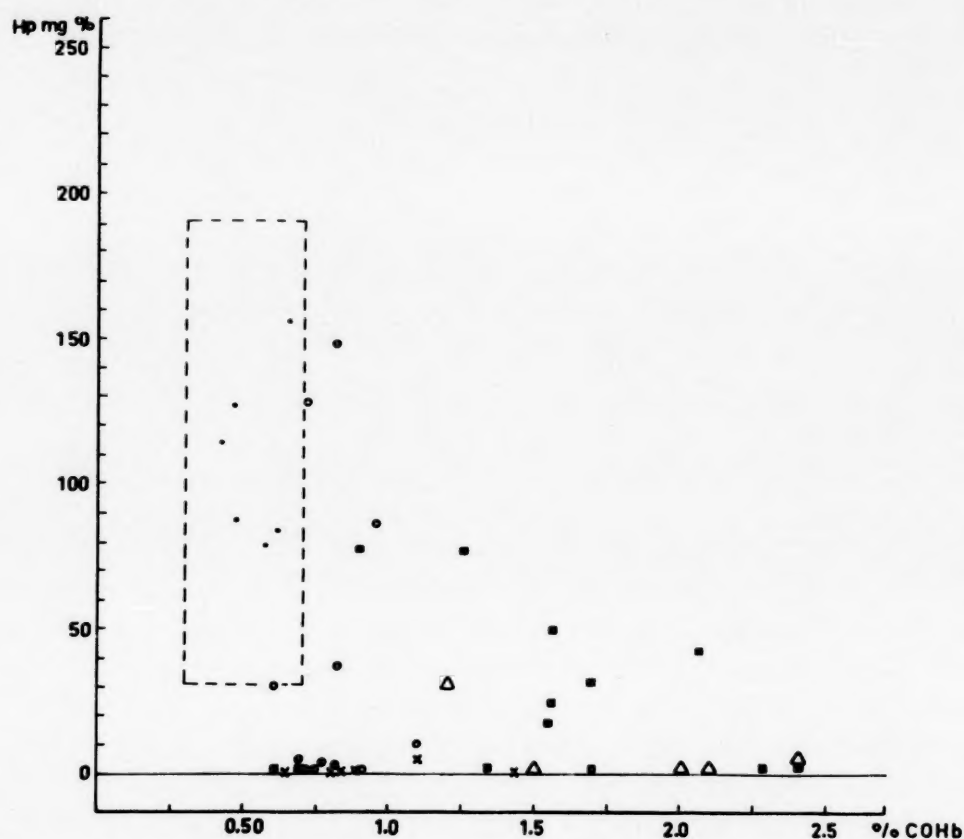


Fig. 2. Verhältnis zwischen Haptoglobin und % COHb bei verschiedenen Anämieformen. Das gestrichelte Feld entspricht den Normalwerten. • Sideropene Anämie; × Perniziöse Anämie; △ Kong. hämolytischer Ikterus; ■ Erworbene hämolytische Anämie; o Cirrhosis Hepatis.

erworbene hämolytische Anämie sowie einzelnen Fällen von Blutungsanämie und Osteomyelosclerose mit kompensatorischer splenogener Erythropoese. Ausserdem wurde in 11 Fällen mit Leberzirrhose der Gehalt an COHb im Blut mit dem Haptoglobinspiegel verglichen. Alle Untersuchungen wurden gleichzeitig oder an nacheinanderfolgenden Tagen ausgeführt. Die Haptoglobinwerte die zum Vergleich mit der Erythrocyten-Lebensdauer benützt wurden, sind ein Mittelwert von 2–3 Bestimmungen die während derselben Zeit gemacht wurden.

Fig. 1 gibt das Verhältnis zwischen dem Haptoglobingehalt im Serum und der im Fäzes ausgeschiedenen Menge Gallenfarbstoff an. Die bei der Analyse erhaltenen Gallenfarbstoff-Werte sind entsprechend einer normalen Hb-konzentration umgerechnet. Die Zahl der Untersuchungen ist leider aus praktischen Gründen klein, aber es geht doch aus der Figur deutlich hervor, dass erhöhte Gallenfarbstoff-Ausscheidung im

allgemeinen mit einem verminderten Haptoglobinspiegel parallel geht. In einzelnen Fällen von erworbener hämolytischen Anämie sind doch bei erhöhter Gallenfarbstoff-Ausscheidung subnormale oder sogar normale Hp-Werte vorhanden.

Fig. 2 stellt das Verhältnis zwischen der *COHb-Konzentration im Blut und dem Haptoglobinspiegel* dar. SJÖSTRAND⁷ und später LUDVIG *et al.*⁸ haben gezeigt, dass bei der Spaltung des Hämoglobins Kohlenoxyd gebildet wird und dass die Konzentration von Kohlenoxyd-Hämoglobin im Blut mit der Menge katabolisierten Hämoglobin proportional ist⁹. Aus Fig. 2 ergibt sich, dass eine indirekte Proportionalität zwischen Hp/s und % COHb vorliegt. Bei sideropener Anämie ist der Blutgehalt beider Komponenten normal, während bei perniziöser Anämie schon eine geringe Erhöhung des % COHb mit Ahaptoglobinämie verbunden ist. Bei erworbenen hämoly-

TABELLE I

FREQUENZ VON METHÄMALBUMINÄMIE IN EINEM KLINISCHEN MATERIAL VON 500 FÄLLEN

Diagnose	Anzahl Fälle	Hp > 5 mg%		Hp < 5 mg%	
		MHA+	MHA—	MHA+	MHA—
Neugeborene	9	0	2	7	0
Cirrhosis hepatis	88	0	68	4	16
Anaemia perniciosa unbeh.	33	0	8	11	14
Icterus haemolyt. cong.	11	0	1	1	9
Anaemia haemolyt. aq.	114	0	40	11	63
Übrige	245	0	241	1	3
Summe	500	0	360	35	105

tischen Anämien kommen dagegen relativ hohe % COHb-Werte gleichzeitig mit mässig erniedrigten Hp/s-Werten vor. Schliesslich geht aus dieser Figur hervor, dass von 11 Fällen mit Leberzirrhose 10 eine mässige Erhöhung des % COHb zeigen. Die niedrigen Hp/s-Werte, die bei avanzierter Leberzirrhosen vorliegen könnten also nicht nur durch erniedrigte Synthese sondern auch durch einen gesteigerten Hb-katabolismus erklärt werden. Bei dem Vergleich *Hp/s und Erythrozyten-Lebensdauer* ergibt sich in 38/40 Fällen eine direkte Proportionalität zwischen Lebensdauer und Hp-gehalt. In diesem Material war, mit einer einzigen Ausnahme, Ahaptoglobinämie in all den Fällen vorhanden die eine scheinbare 50% Erythrozyten-Lebensdauer unter 17 Tagen hatten (welches eine mittlere Erythrocyten-Lebensdauer von etwa 45 Tagen entspricht). Dagegen haben wir mehrmals Fälle beobachtet bei denen die Ahaptoglobinämie nicht mit einer Verkürzung der Erythrozyten-Lebensdauer verbunden war.

Methämalbumin (ein Komplex zwischen Hämatin und Serumalbumin) wird unter anderen von FAIRLEY¹⁰ als ein Indizium für intravasaler Hämolyse angegeben. Aus Tabelle I geht hervor, dass unter Seren von 500 Patienten mit verschiedenen Krankheiten kein einziges gefunden wurde, in welchen Methämalbumin und Haptoglobin gleichzeitig vorhanden waren. In den 140 "haptoglobinfreien" Seren konnte Methämalbumin in 35 Fällen nachgewiesen werden. Interessant ist auch die Häufigkeit mit welcher man Methämalbumin bei den verschiedenen Anämieformen findet. Die Frequenz ist am grössten bei Patienten mit perniziöser Anämie und bei Neugeborenen bei denen man nur ausnahmsweise Haptoglobin nachweisen kann, während Methäm-

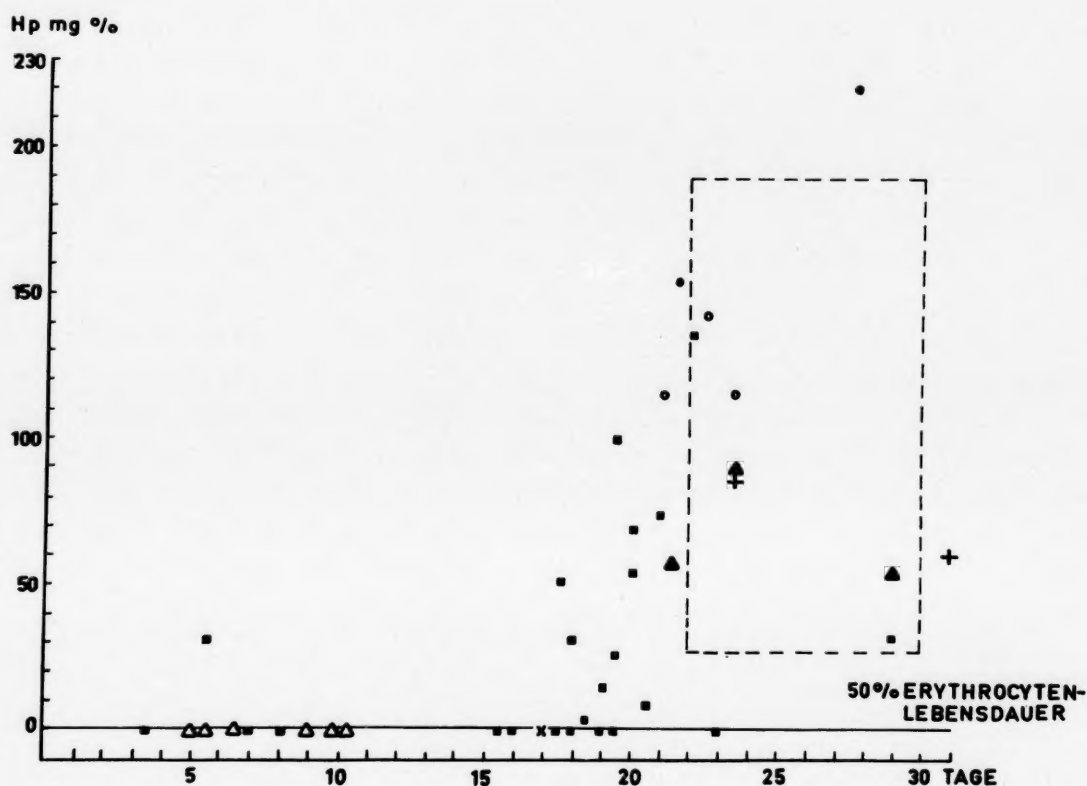


Fig. 3. Verhältnis zwischen Erythrocyten-Lebensdauer und Haptoglobin bei Fällen mit Anämie oder Hyperbilirubinämie. Das gestrichelte Feld entspricht den Normalwerten. o Anämie unbek. Etiologie; • Sideropene Anämie; \triangle Kong. hämolytischer Ikterus; ■ Erworbene hämolytische Anämie; \times Perniziöse Anämie; \blacktriangle Konstitutionelle Hyperbilirubinämie; + Kong. hämolytischer Ikterus nach Splenektomie.

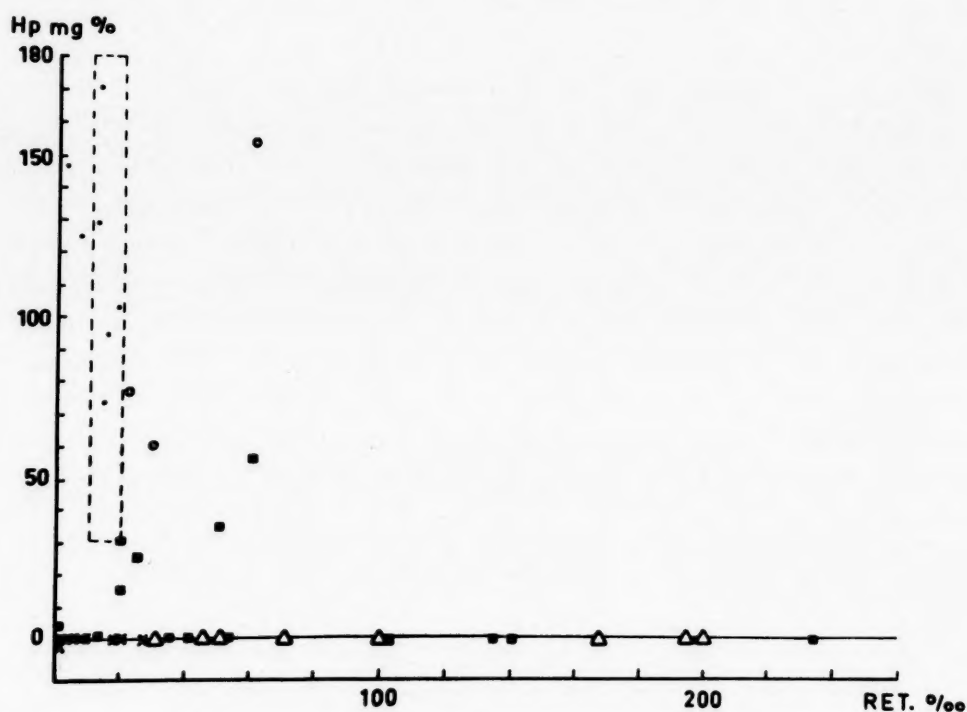


Fig. 4. Verhältnis zwischen Haptoglobin und Retikulocyten bei verschiedenen Anämieformen. Das gestrichelte Feld entspricht den Normalwerten. • Sideropene Anämie; o Kronische Blutungsanämie; \times Perniziöse Anämie; \triangle Kong. hämolytische Anämie; ■ Erworbene hämolytische Anämie.

bumin nur selten bei kongenitalen hämolytischen Ikterus vorkommt. Die erworbenen hämolytischen Anämien nehmen in dieser Hinsicht eine Zwischenstellung ein.

Fig. 4 gibt schliesslich das Verhältnis zwischen der *Retikulozyten-Zahl* und den *Hp/s* an. Auch hier findet man eine indirekte Proportionalität zwischen den beiden Variablen, mit Ausnahme von den Fällen mit unbehandelter perniziöser Anämie bei denen eine niedrige Retikulozyten-Zahl und Ahaptoglobinämie häufig zusammen vorkommen. Von Interesse in dieser Figur sind auch die 3 Fälle von Blutungsanämie und Retikulozytose deren Haptoglobinwerte normal sind. Es geht aus den vorgelegten Daten deutlich hervor, dass ein gesteigerter Hämoglobin-Umsatz mit einer Senkung des Haptoglobingehaltes im Blut verbunden ist. Die oben angeführten normalen Haptoglobinwerte bei Blutungsanämien mit kompensatorisch vergrösserter Erythropoese, sprechen dafür, dass der gesteigerte Hämoglobin-Abbau eher als die Hämoglobin-Synthese für dieses Phänomen verantwortlich gemacht werden kann. *Hämolyse* kann prinzipiell auf 3 Wegen zustandekommen: sie kann intravasal, extravasal oder medullär sein. (Mit medullärer Hämolyse versteht sich ein gesteigerter aber ineffek-

TABELLE II

VERHALTEN DER ERYTHROKINETISCHEN DATEN BEI DEN VERSCHIEDENEN TYPEN VON HÄMOLYSE

	<i>Hp</i>	<i>Gallenpig./ Fäzes</i>	<i>COHb</i>	<i>Erythrocyt. Lebensdauer</i>	<i>MHA</i>	<i>Retik.</i>
Intravasale Hämolyse	—	+	+	—	+	+
Extravasale Hämolyse	n	+	+	—	—	+
Medulläre Hämolyse	—	+	+	n	+	—

+ gesteigert; — gesenkt; n: normal.

tiver Hämoglobin-Produktion.) Das Verhalten des Haptoglobins und der anderen erythrokinetischen Daten bei den verschiedenen Typen von Hämolyse wird in Tabelle II illustriert. Die hier vorgelegten Daten, die auch mit den erhaltenen Ergebnissen der Experimente mit intravenöser Hämoglobinzufuhr übereinstimmen¹¹, lassen sich also am besten mit einem vermehrten Verbrauch des Haptoglobins durch Komplexbildung mit dem bei Hämolyse freigemachten Hämoglobin, erklären. Dies scheint nicht nur bei intravenöser und medullärer, sondern, wenigstens teilweise, auch bei extravasaler Hämolyse (die angeblich intrazellulär im RES der Leber und Milz zustandekommt) der Fall zu sein. Wie und wo die HbHp Komplex-Bildung bei extravasaler Hämolyse geschieht ist noch unklar. Auch die Frage ob das Haptoglobin bei dem normalen Hämoglobinumsatz beteiligt ist, kann vorläufig nicht beantwortet werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Plasmahaptoglobine werden bei intravasaler Hämolyse aus dem Kreislauf eliminiert. Der langsame Wiederanstieg der Plasmahaptoglobine nach experimenteller Elimination durch intravenöse Hämoglobinzufuhr deutet entweder eine langsame Haptoglobin-Neubildung oder einen schnellen Haptoglobin-Abbau an. Bei Patienten mit hämolytischen Anämien findet man niedrige Plasmahaptoglobinwerte auch wenn kein Anhalt für intravasale Hämolyse vorliegt. In einem Material von verschiedenen

Anämieformen wurde teils die Plasmahaptoglobin-Konzentration teils die Grösse des Erythrozyten-Abbaues resp. der Erythrozyten-Neubildung bestimmt. Die Ergebnisse werden mit Hinsicht auf die Beziehungen zwischen Haptoglobin- und Hämoglobin-umsatz diskutiert.

SUMMARY

HAPTOGLOBIN AND ERYTHROKINETICS

In intravascular haemolysis haptoglobins are eliminated from the bloodstream. The slow return of plasma haptoglobin after experimental elimination by intravenous injection of haemoglobin seems to indicate a slow rate of production or a high rate of consumption of the haptoglobins. In haemolytic anaemia the plasma haptoglobin level is low even in the absence of demonstrable intravascular haemolysis. Determinations were made of the plasma haptoglobin level and of the rate of formation and destruction of the erythrocytes by conventional methods in a series of patients with various types of anaemia. The results are discussed with reference to the role played by haptoglobin in the metabolism of haemoglobin.

LITERATUR

- ¹ M. NYMAN, *Clin. Chim. Acta*, 3 (1958) 111.
- ² M. F. JAYLE UND G. BOUSSIER, *Exposés ann. biochim. méd.*, 17 (1955) 157.
- ³ M. NYMAN, unveröffentlicht.
- ⁴ L. HEILMEYER UND W. KREBS, *Biochem. Z.*, 231 (1931) 393.
- ⁵ T. SJÖSTRAND, *Acta Physiol. Scand.*, 16 (1948) 201.
- ⁶ M. F. JAYLE, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 876.
- ⁷ T. SJÖSTRAND, *Acta Physiol. Scand.*, 24 (1951) 314.
- ⁸ G. D. LUDVIG, W. S. BLAKEMOORE UND D. L. DRABKIN, *J. Clin. Invest.*, 36 (1957) 912.
- ⁹ T. SJÖSTRAND, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 1 (1949) 201.
- ¹⁰ N. H. FAIRLEY, *Brit. Med. J.*, (1940, II) 213
- ¹¹ C. B. LAURELL UND M. NYMAN, *Blood*, 12 (1957) 493.

EINE QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES TRYPTOPHANREICHEN SERUMPRAEALBUMIN IM AGAR-AGAR

F. W. ALY UND H. SCHAUPP

Medizinische Universitätsklinik, Marburg/Lahn (Deutschland)

Mit einer einfachen papierelektrophoretischen Methode^{1, 2} können quantitative Aussagen über die Praealbuminkonzentration (PA) im Serum gemacht werden. Es wurde festgestellt, dass das PA mit einer Konzentration von approximativ 27 mg% ein regelmässiger Bestandteil des normalen Serumeiweissbildes ist. Das untersuchte Protein ist mit dem von SCHULTZE, SCHÖNENBERGER UND SCHWICK³ isolierten lipidfreien "tryptophanreichen PA" identisch und entspricht dem von GRABAR⁴ untersuchten Protéines rapides.

Mit einer papierelektrophoretischen Methode¹ findet sich gelegentlich direkt vor dem Albumin eine schwach mit Sundanschwarz anfärbbare Zone, die nach Konzentration des Serums mit eiweissdichten Filtern⁵ verstärkt auftritt.

Bisher wurde das Verhalten des PA^{1, 2, 5-7} bei verschiedenen Krankheitszuständen, die Beziehungen zu Stoffwechselvorgängen, zur Leberfunktion und zu einigen in der Leber gebildeten Proteinen untersucht. Verminderungen des PA fanden sich bei hepatozellulären Schäden (Virushepatitis, Leberzirrhose), schweren Störungen der Blutbildung (Agranulozytose, akute Myeloblastose, fortgeschrittene Myelose, Lymphadenose), generalisierten Systemerkrankungen (Lymphosarcom, Retikuloze, Morbus-Hodgkin-Sternberg), bei Tuberkulosen, Krebskachexien und schweren Herzinsuffizienzen mit Leberstauung. Die PA-Grösse normalisierte sich bei Besserung des Krankheitsbildes und ist gegen Ende der Schwangerschaft und bei nephrotischen Syndromen verschiedener Genese vermehrt nachweisbar.

Um die bisherigen Kenntnisse über das Verhalten des PA im Serum zu erweitern, musste eine einfache quantitative Bestimmungsmethode gefunden werden. Der im Folgenden mitgeteilten elektrophoretischen Modifikation liegen Erfahrungen anderer Autoren^{4, 8-11} mit der Agar-Technik zu Grunde.

METHODIK

Die Elektrophorese-Einrichtung wurde im Zusammenhang mit der papierelektrophoretischen Bestimmung des PA beschrieben¹.

Agar-Bereitung

2.5 g Behring-Agar reinst werden 5 min in 180 ml Aqua dest. in einem Rundkolben mit Rücklaufkühler gekocht und anschliessend die gleiche Menge Michaelis-puffer pH 8.6, μ 0.1 hinzugefügt. In einer 40 × 43 cm grossen Glaswanne werden genau wagerecht 18 4 × 21 cm grosse Glasplatten gelegt und blasenfrei gleichmässig mit Agar übergossen. Im Kammerdeckel soll ein angefeuchtetes Filterpapier liegen. Auf die ausgeschnittenen Agarstreifen wird frühestens nach 4 Stunden genau 0.07 ml

Serum pipetiert. Dazu wird vorher 7 cm vom positiven Pol mittels kleiner Filterpapierstreifen eine flache Rinne abgesaugt ($0.5 \times 6 \times 36$ mm), die so angelegt sein muss, dass das Serum gerade an den Rand des Agars diffundieren kann. Das Serum zieht innerhalb von 15 min vollständig ein. Nach 8-stündiger Laufzeit bei 90 V (75 mA) werden die Albumine und Globuline, die wegen ihrer hohen Konzentration im durchfallenden Licht zu begrenzen sind, verworfen und die verbleibende PA-Fraktion 4 Stunden in 4% Essigsäure fixiert.

Färbung

Jeweils 18, durch Umlegen auf Filterpapier vollständig getrocknete Agarstreifen werden zusammen 5 Stunden lang gefärbt (Färbebad: 6 g Amidoschwarz 10 B, 50 g Sublimat, 20 ml Essigsäure, 1 l Aqua dest.) und exakt 5 min lang in 3 l 2%iger Essigsäure durch vorsichtiges Schwenken entfärbt.

Auswertung

Die durch Photometrie im Extinktionsschreiber (Zeiss) erhaltenen Gauss-Kurven werden planimetriert und aus den Planimeterwerten mittels eines Faktors die PA-Grösse in mg% errechnet. Der Faktor wird mit Hilfe von Standardstreifen bestimmt und für jede Agarcharge und Änderung der Versuchsbedingungen neu ermittelt. Standardstreifen werden mit bekannten Proteinlösungen entsprechend der mitgeteilten Methode hergestellt. Bei der Färbung wird so vorgegangen, dass je 4 Standardstreifen zusammen mit 18 Serumbestimmungen gefärbt und aus den Mittelwerten mehrerer Färbungen die Planimereinheiten/mg PA ermittelt werden. Die weitere Berechnung wird an einem Beispiel erläutert.

Praealbuminmittelwert ($n = 3$) einer untersuchten Serumprobe: 12.2 Planimereinheiten. Planimeterwert für 1 mg reines Praealbumin (Mittelwert $n = 36$): 1026.

Aufgetragene Serummenge: 0.07 ml Serum.

Gesamteiweiss (Biuret): 7.2 g%.

Faktor	PA
$\frac{100}{1026 \times 0.07} = 1.39$	$1.39 \times 12.2 = 17 \text{ mg \%}$
	$\frac{100 \times 17}{7200} = 0.24 \text{ rel. \%}$

Untersuchung zur Methode *

Die Reproduzierbarkeit der Methode wird mit Reinsubstanzen und Seren verschiedener PA-Konzentration geprüft. Ein nüchtern entnommenes Serum wird in mehrere Portionen aufgeteilt und eingefroren. Die Temperatur von -15° ist ohne Einfluss auf die PA-Grösse. An 6 verschiedenen Tagen werden von frisch aufgetautem Serum 44 PA-Bestimmungen gemacht und in 4 verschiedenen Färbeansätzen gefärbt (Tabelle I).

* Herrn Prof. H. E. SCHULTZE, Behringwerke Marburg/L., danken wir für die freundliche Überlassung von gereinigtem Agar und Reinproteinen (tryptophanreiches Praealbumin und Albumin reinst).

TABELLE I

Versuch Nr. <i>n</i>	1 6	2 9	3 6	4 7	5 9	6 7	Summe 44	1-6 6
Mittelwert (Planimeterwert)	13.5	12.2	12.0	12.0	11.7	13.3	12.2	12.4
Streuung (σ)	1.28	1.5	0.75	1.48	1.27	0.37	1.37	0.91
3 σ_M in %	11.6	12.1	7.7	13.2	10.6	4.2	5.1	8.8

Um den Anteil der Einzelfehler abschätzen zu können, haben wir

1. in einem Serum 9 \times das PA bestimmt (Vers. Nr. 2),
2. einen angefärbten Streifen 9 \times photometriert und ausgewertet,
3. die Ergebnisse einer einmaligen photometrischen Ausmessung planimetriert. Die Zusammenstellung in Tabelle II zeigt die dabei ermittelten Fehler.

Die Reproduzierbarkeit der Anfärbung wird mit den Mittelwerten der Versuche Nr. 1-6 und mit Hilfe von Standardstreifen geprüft.

TABELLE II
EINZELFEHLER

	1	2	3
Mittelwert	12.2	13.9	13.9
Streuung (σ)	1.5	0.25	0.16

REPRODUZIERBARKEIT

	1	2	3	4	5	6
Anz. d. Färbungen	10	9	9	1	1	1
Best. pro Färbung	2	4	4	9	9	9
Mittelwert (Planimeterwert)	65.9	72.7	51.2	97.4	71.1	35.6
Streuung (σ)	2.6	2.7	4.0	3.6	3.2	2.0
3 σ_M in %	4.0	4.0	7.8	3.7	4.6	5.6

Es zeigt sich, dass die Streuung bei 9 zusammen gefärbten Einzelstreifen nicht kleiner ist als bei 9 getrennt gefärbten Streifenpaaren (4-fachbestimmung).

DISKUSSION DER METHODE

Folgende Fehlermöglichkeiten, die zum Teil auch bei der papierelektrophoretischen Untersuchung des Serumeiweissbildes auftreten, sind zu beobachten:

- (a) schlechte Abtrennung des PA vom Albumin;
- (b) ungenügende Reproduzierbarkeit der Anfärbung;
- (c) Messfehler bei der photometrischen Auswertung;
- (d) Fehler beim Einzeichnen der Basislinie und der Gauss-Kurven;
- (e) Pipetier- und Planimetrierfehler.

Nicht jede Agarsorte scheint wegen ihrer electroendosmotischen Eigenschaften für die Darstellung der PA gleich gut geeignet. Für vergleichende PA-Bestimmungen muss deshalb der für die jeweiligen Versuchsbedingungen charakteristische Umrechnungsfaktor bestimmt werden.

Anfangs machte das Auftragen der relativ grossen Eiweissmenge (0.07 ml Serum) Schwierigkeiten. Wie bei der papierelektrophoretischen Methode wird das PA durch

Auftragen erhöhter Serummengen zur Darstellung gebracht. Dies scheint nach unseren Erfahrungen der schonendste Weg zu sein. Bei dem Versuch, das Serum in kleine Agarschlitzte einzusetzen oder in kleine Agarstückchen hineindiffundieren zu lassen, entstehen Artefakte, die einen Albuminforläufer vortäuschen (Fig. 1 a). Durch die gewählte Auftragsart und das Abschneiden der albuminübersättigten Agarstückchen verschwinden die störenden Vorlauffeffekte beim Fixieren (Fig. 1 b). Fig. 1 c bis 1 d lässt die saubere Abtrennung des Praealbumins vom Serum erkennen, die sehr gut reproduzierbar ist. Streifen, bei denen sich der kathodische PA-Schenkel unge-

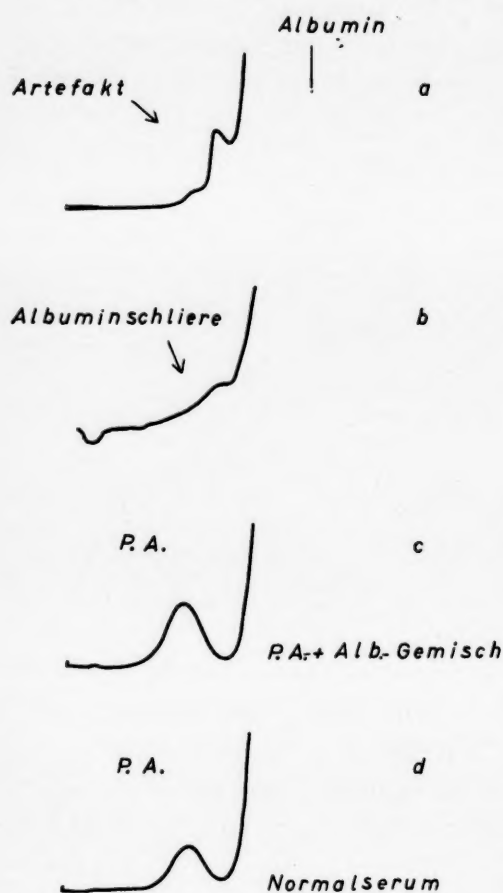


Fig. 1. (a) Artefakt vor dem Albumin, bedingt durch die Art der Auftragung des Serums mittels kleiner Agarschlitzte. (b) Verwischung des PA durch Albumin, das beim Fixieren teilweise nach vorne ausläuft. (c) Praealbumin-Albumin Gemisch; die Albuminkonzentration ist so niedrig gehalten, dass kein Albumin verwischt. (d) Eine saubere Trennung des PA wird durch Abschneiden des Albumins erreicht, das wegen seiner hohen Konzentration im durchfallenden Licht gut abzugrenzen ist.

Von den Pherogrammen ist lediglich die Basislinie vor dem PA, das PA und der ansteigende Albuminschenkel dargestellt.

nügend der Basislinie nähert, werden nicht ausgewertet. Eine Einzeichnung der Gauss-Kurven ist deshalb einfach. Stärkeren Einfluss auf die Genauigkeit der PA-Bestimmung kann die Einzeichnung der Basislinie nehmen. Es muss deshalb eine ausreichend lange (2–3 cm) und saubere Null-Linie vor dem PA bestehen. Der verwendete Behring-Agar erfüllt diese Bedingungen. Wichtig für die photometrische Auswertung im durchfallenden Licht¹² ist, dass sich das PA gleichmässig quer zur Laufrichtung im Agarstreifen verteilt. Die Grösse des durch ungleichmässige Verteilung der Proteine hervorgerufenen Fehlers wird von GRASSMANN UND HANNIG¹² untersucht. Der Fehler durch Planimetrieren und Photometrieren macht am Gesamtfehler nur wenig aus. Die durch Färbung und Entfärbung bedingten Fehlermöglichkeiten unterscheiden sich grössenordnungsmässig nicht von der Streuung der Einzelbestimmung. Der Färbefehler geht in die Gesamtfehlerstreuung ein. Für eine PA-Bestimmung wird der Mittelwert aus 3 Einfachbestimmungen zu Grunde gelegt.

Das Prinzip der quantitativen Auswertung besteht darin, dass mit Hilfe reiner Proteinlösungen die Planimetereinheiten/mg aufgetragenes Protein bestimmt werden.

Mit diesem Faktor lässt sich dann leicht die PA-Konzentration in mg% ausdrücken. Wegen der grossen Konzentrationsunterschiede zwischen PA und den übrigen Serumproteinen ist die übliche photometrische Auswertung nicht durchführbar¹²⁻¹⁴. Der von WUNDERLY¹⁵ mit Recht erhobene Einwand gegen die quantitative Auswertung von Serumelektrophoresen im Agar (stärkere Diffusion der Albumine quer zur Laufrichtung als bei den Globulinen) ist für die PA-Bestimmung ohne Bedeutung, da hier versucht wird, nur eine Fraktion zu bestimmen und nicht die rel.% mehrerer Fraktionen. Die Reproduzierbarkeit der Methode hängt nach unseren Erfahrungen im wesentlichen von der exakten Durchführung der Entfärbung und der Bestimmung der Umrechnungsfaktoren ab. Unter Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen sind die Übereinstimmungen von Doppelbestimmungen, wie die Beispiele in Tabelle III zeigen, gut.

TABELLE III

Name	Untersuchungsdatum	PA mg%	Diagnose	Abweichung in %
Re.	10.2	8.9	Virushapatitis	7
	12.2	8.3		
Ah.	31.10	11.8	Akute Myeloblastose	9
	1.11	12.8		
Le.	12.12	15.0	Lupus erythematodes	2
	13.12	14.7		
Tw.	4.9	34.2	Herzinfarkt	8
	5.9	37.4		

Untersuchungen an Normalpersonen

Die Normalwerte im Serum werden bei 17 gesunden Männern und 15 gesunden Frauen bestimmt. Aus 32 Bestimmungen errechnet sich eine biologische Schwankung¹⁵ der PA-Konzentration im Serum von 12-31 mg% (Mittelwert $\pm 2 \sigma$ Biol. = 22.1 ± 9.2 mg%). Die mit der Agar-Methode gewonnenen Werte stimmen gut mit den papier-elektrophoretisch bestimmten Praealbuminkonzentrationen im Serum überein (Tabelle IV).

TABELLE IV

Praealbuminbestimmung	Biol. Schwankung mg%	Mittelwert mg%	n
Agar-Methode	12-31	22	32
Papierstreifen-Methode	20-34	27	17

n = Anzahl der untersuchten Normalpersonen.

Beispiele für die Anwendung der Methode in der Klinik

In Fig. 2 sind zur Veranschaulichung der Methode die Pherogramme von PA-Elektrophoresen aufgeführt. Bei Hepatitiden, Leberzirrhosen, Myeloblastosen und Lymphogranulomatosen wurde gefunden, dass die PA-Konzentration im Serum in enger Beziehung zur Schwere des Krankheitsbildes und -verlaufes steht. Dabei laufen Normalisierungen der Praealbuminkonzentration den Änderungen der Albuminkonzentration zeitlich um Tage voraus.

Literatur S. 95

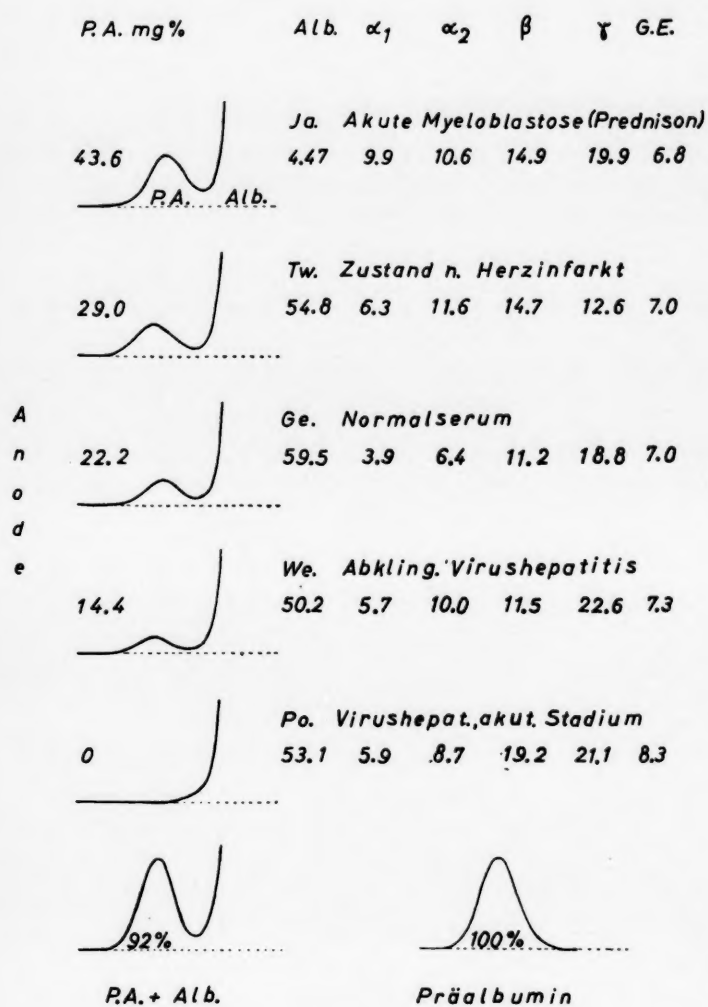


Fig. 2. PA-Elektrophoresekurven bei verschiedenen PA-Konzentrationen im Serum; die PA-Konzentration im Serum schwankt zwischen 0 und 50 mg%. *Ja.* Remission einer akuten Myeloblastose unter Prednisonbehandlung. Es kommt zu einer deutlichen PA-Vermehrung; *Tw.* In Rückbildung begriffener jugendlicher Herzinfarkt mit PA-Vermehrung: Von 100% PA wurden nach Mischung von Albumin im Überschuss 92% wiedergefunden.

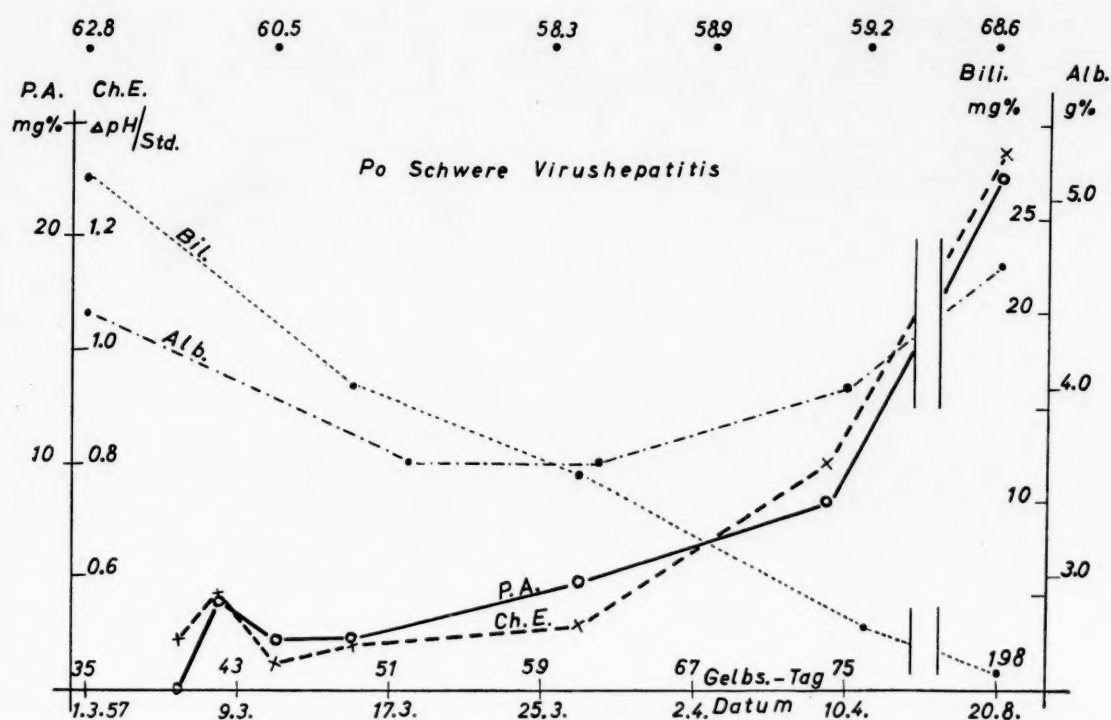


Fig. 3. Verlaufsuntersuchung einer schweren Hepatitis (Patient Po.). (s. Text).

Fall 1. Po. Schwere Virushepatitis (Fig. 3), Krankenbl. Nr. 1519/57.

Einlieferung am 40. Krankheitstag. Milz und Leber vergrößert, Stuhl acholisch, Bilirubin im Serum stark erhöht. Unter der Behandlung mit Laevosan-Infusionen und Vitamin-B-Komplex kommt es zu einem Abfall der Bilirubinwerte im Serum, während Praealbumin und Cholinesteraseaktivität früher als das Körpergewicht ansteigen. Bei einer Nachuntersuchung 4 Monate später sind Bilirubin, Praealbumin und Cholinesteraseaktivität wieder normal. Trotz der schweren Hepatitis sind die Veränderungen des Serumalbumin geringer ausgeprägt, während das Praealbumin deutlich reagiert. Vergleichsweise wird als empfindliche Leberfunktionsprobe die Cholinesteraseaktivität im Serum mitbestimmt¹⁶.

Fall 2. Re. Vorwiegend anikterisch verlaufende Virushepatitis. (Fig. 4), Krankenbl. Nr. 618/58.

Zufälligerweise wurde einige Monate vor der Erkrankung der PA-Spiegel im Serum bestimmt. Im Prodromalstadium, vor Auftreten des Ikterus ist das Praealbumin deutlich erniedrigt. Der Patient suchte zu diesem Zeitpunkt wegen gastrointestinaler und rheumatischer Beschwerden den Arzt auf. Mit Besserung des Allgemeinzustandes, Rückgang des Serumbilirubins und Zunahme des Appetits und Körpergewichtes kommt es zu fortschreitender Normalisierung des Praealbumins und der Cholinesteraseaktivität. Hier sind die Veränderungen der Cholinesteraseaktivität ebenso wie die Veränderungen des Albumins deutlich geringer als die PA-Verminderung ausgeprägt.

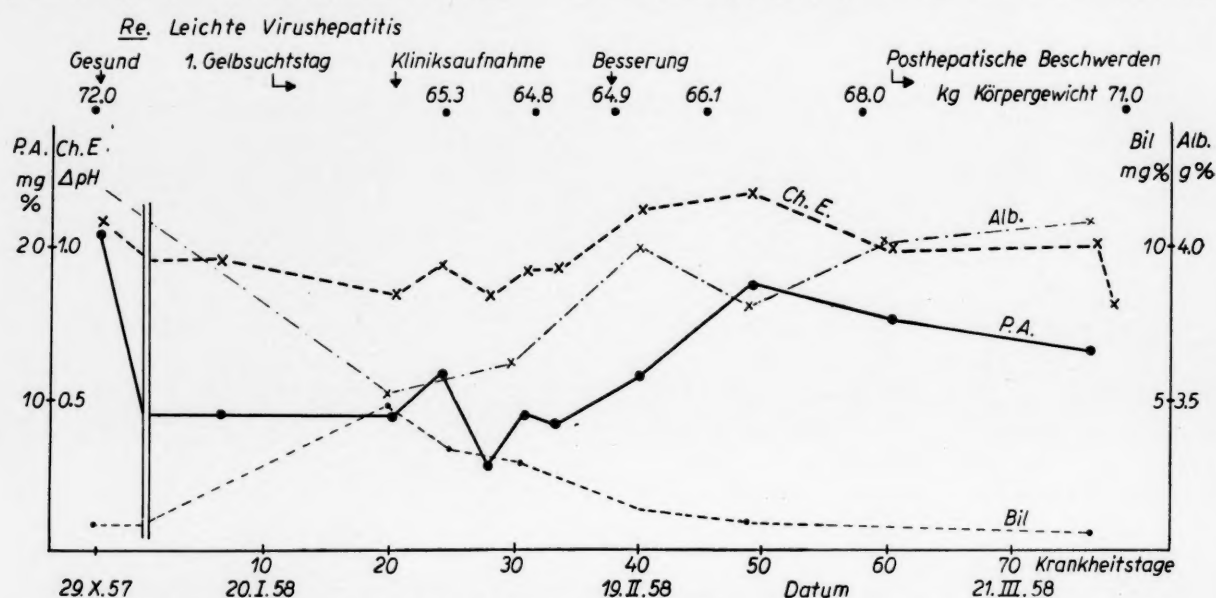


Fig. 4. Verlaufsuntersuchung einer vorwiegend anikterisch verlaufenden Virushepatitis (Patient Re.) (s. Text).

In Tabelle V sind einige typische Serumeiweissbilder mit den dazugehörigen PA-Konzentrationen mitgeteilt.

TABELLE V

		<i>Praealbumin</i>		<i>Albumin</i>		<i>Globulin, rel%</i>				<i>Gesamt- eiweiss</i>
<i>Name</i>	<i>Diagnose</i>	<i>mg%</i>	<i>rel%</i>	<i>mg%</i>	α_1	α_2	β	γ	<i>g%</i>	
We.	Virushepatitis	1.4	0.02	38.7	6.5	7.7	18.4	28.7	7.2	
Ra.	Virushepatitis	5.7	0.09	34.5	5.5	7.0	10.5	42.5	6.5	
Ap.	Leberzirrhose	4.8	0.06	38	3.8	7.2	9.4	41.1	7.7	
Ju.	Leberzirrhose	2.4	0.03	14.8	9.3	8.2	12.4	55.3	7.0	
Be.	Bronchialca.	2.8	0.05	11.0	12.1	18.3	17.1	41.5	6.1	
Kn.	Sarkom	6.7	0.09	31.9	9.8	19.2	14.8	24.3	7.9	
Be.	Nephrot. Syndrom	21.8	0.66	31.4	8.2	25.0	17.3	18.1	3.3	
Pa.	Nephrot. Syndrom	21.3	0.50	14.9	6.9	31.7	31.7	14.8	4.3	

Wichtiger als Einzelbestimmungen des PA scheinen aber Verlaufsbeobachtungen der PA-Konzentration im Serum zu sein, über die in anderem Zusammenhang ausführlicher berichtet wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode zur quantitativen Bestimmung des PA im Agar-Agar beschrieben, die im Prinzip darauf beruht, dass eine grössere als üblicherweise zur Papierelektrophorese genommene Serummenge (0.07 ml) in den Agar gebracht wird. Das elektrophoretisch abgetrennte Protein wird nach der Methode von GRASSMANN UND HANNIG unter Verwendung eines Anfärbbarkeitsfaktors (Planimetereinheiten/mg aufgetragenes Protein) quantitativ bestimmt.

Die Normalwerte bei 32 gesunden Personen schwanken zwischen 12–31 mg% (Mittelwert $\pm 2\sigma = 22.1 \pm 9$ mg%). Das PA ist ein normaler Bestandteil des normalen menschlichen Serumeiweissbildes. Mit der beschriebenen Methode ist es möglich, bei klinischen Verlaufsuntersuchungen quantitative Aussagen über die PA-Grösse im Serum zu machen.

SUMMARY

A QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE TRYPTOPHAN-RICH SERUM-PREALBUMIN IN AGAR-AGAR

A method for the quantitative determination of prealbumin in agar-agar is described, in which the amount of serum (0.07 ml) introduced into the agar is larger than that normally used in paper electrophoresis. After electrophoretic separation the protein is determined quantitatively according to the method of GRASSMANN AND HANNIG, using a dye-binding factor (planimeter units/mg protein applied).

Normal values for 32 healthy persons ranged from 12–31 mg% (mean $\pm 2\sigma = 22.1 \pm 9$ mg%). Prealbumin is a component of normal human serum protein. This method, with which it is possible to make quantitative estimations of the prealbumin content of the serum, can be used in clinical examinations to follow the course of a disease.

LITERATUR

- ¹ F. W. ALY UND H. NIEDERHELLMANN, *Klin. Wochschr.*, in Druck, 1958.
- ¹ F. W. ALY UND H. NIEDERHELLMANN, *Wochschr.*, in Druck, 1958.
- ² H. NIEDERHELLMANN, *Dissertation*, Marburg/Lahn, 1958.
- ³ H. E. SCHULTZE, M. SCHÖNENBERGER UND G. SCHWICK, *Biochem. Z.*, 328 (1956) 267.
- ⁴ P. GRABAR, *Arch. sci. biol. (Bologna)*, 39 (1955) 589.
- ⁵ J. LEWIN, J. GHATA UND E. AZE'RAD, *Presse méd.*, 64 (1956) 1433.
- ⁶ F. W. ALY, 5. Kongress Europ. Ges. f. Haematologie, Freiburg, 1955, S. 347.
- ⁷ F. W. ALY, 6. Kongress Europ. Ges. f. Haematologie, Kopenhagen, 1957, in Druck (1958).
- ⁸ G. SCHWICK, *Laboratoriums-Blätter*, 8 (1958) 11.
- ⁹ J. URIEL UND P. GRABAR, *Ann. inst. Pasteur*, 90 (1956) 427.
- ¹⁰ R. WIEME UND J. M. RABAY, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 112.
- ¹¹ R. WIEME, persönliche Mitteilung.
- ¹² W. GRASSMANN UND K. HANNIG, *Z. physiol. Chem.*, 290 (1952) 1.
- ¹³ G. RIVA, *Das Serumeiweissbild*, Verlag Hans Huter, Bern, 1957.
- ¹⁴ F. WUHRMANN UND C. WUNDERLY, *Die Bluteiweisskörper des Menschen*, 3. Aufl., Benno Schwabe u. Co. Basel, 1957.
- ¹⁵ C. WUNDERLY, *Klin. Wochschr.*, 15 (1958) 758.
- ¹⁶ H. SCHAUPP, *Dissertation*, Marburg/Lahn, 1958.

ISOLATION AND DESCRIPTION OF A FEW PROPERTIES OF THE β_{2A} -GLOBULIN OF HUMAN SERUM

J. F. HEREMANS, M.-TH. HEREMANS AND H. E. SCHULTZE

Medical Department, University Clinic St. Pierre, Louvain (Belgium) and the Behringwerke, Marburg/Lahn (Germany)

Conventional electrophoretic graphs obtained with normal human sera show, between the well-individualized β - and γ -peaks, a more or less pronounced depression, which is used as a landmark for planimetric work. This also holds for those techniques¹ that produce a split β -band. In some pathological conditions, for instance in cirrhosis, the separation of β and γ may become completely indistinct. For such sera at least, the existence of proteins with intermediate mobility may be assumed. Moreover, many cases of myeloma and macroglobulinemia Waldenström are characterized by the appearance of large abnormal protein peaks in this region. The substances responsible for these peaks have been given various designations, such as β_2 , γ_1 , M or ζ .

Recently our knowledge of the nature of these β_2 - (or γ_1 -) proteins has been increased by some more precise information. Thus, GRABAR *et al.*², using the immuno-electrophoretic technique, has established beyond doubt that the γ -globulins really consist of a whole family of components with identical antigenic specificity. The most rapid members reach the slower α_2 region, and the slowest molecules extend to the cathodic end of the graph. From this it follows that the so-called β_2 (or M , or γ_1 , or ζ) region at least contains some " γ -globulin" (using the word in its immunological meaning).

Next, KUNKEL's group³ succeeded in preparing a high-molecular weight component, whose mobility slightly exceeds that corresponding to the classical γ -peak. Although the final proof has not yet been given, it may be assumed with reasonable certainty that KUNKEL's heavy γ_1 -globulin at least partially coincides with an antigenic constituent, which BURTIN and co-workers⁴ called " β_{2M} ". The latter protein appears to be appreciably increased in cirrhotic sera, as is KUNKEL's heavy γ_1 -globulin, and it has been shown to be specifically involved in macroglobulinemia Waldenström⁴.

Finally, a third globulin with characteristic β_2 mobility has been known since the very first immuno-electrophoretic investigations of human sera, performed by GRABAR AND WILLIAMS² in 1953. It was merely called " β_2 -globulin" by them, until the discovery of the " β_2 -macroglobulin" precipitation line prompted them to change the name to " β_{2A} -globulin", in order to avoid confusion.

This is the protein that will be considered in the present publication.

ISOLATION

All our attempts to isolate the β_{2A} -globulin from human plasma or serum have been based upon the hypothesis that it is a substance with high resistance to precipitation with zinc ions. This idea originated from a consideration of the following well-

known facts. First, it has been shown by immuno-electrophoresis that many β -myeloma sera show an enormously increased β_{2A} -precipitation line. Indeed, in some cases this protein seems to constitute the whole of the so-called "paraprotein peak". The majority of the γ -, and many of the β -type myelomas, however, seem to derive their "paraprotein" from the γ -antigen⁵. On the other hand the vast majority of the γ -myelomas, and some β -myelomas show extremely disturbed flocculation reactions, when tested by KUNKEL's zinc sulfate turbidity test, but a few myelomas, all or almost all of β -type, show an unusual stability towards this zinc ion precipitation⁶. We postulated therefore that this stability and the β_{2A} nature of the abnormal protein fraction corresponded, a fact which was confirmed by the analysis of a large number of myelomatous sera (to be published).

We found that the supernatant obtained from a conventional KUNKEL test on normal serum still contained all of its β_{2A} -globulin, but that large quantities of γ -globulin also remained in solution. An attempt was made to increase the selectivity of the zinc action by increasing its concentration to 50 mM; this was obtained by using COHN's Method XII. Finally a zinc sulfate concentration of 100 mmoles/l, pH values around neutrality (after zinc sulfate addition), low ionic strength and temperatures ranging from +25° to +29°, were found to result in practically complete separation of β_{2A} - and γ -globulins.

The zinc ions were subsequently removed by adding 1 to 2 g% glycine.

Preliminary trials showed that 1.8 M ammonium sulfate completely precipitated the β_{2A} -globulin of normal serum. Therefore the above described glycine-containing supernatant was submitted to this salting-out procedure, which yielded a mixture of α_2 - and β_2 -globulins, of which about 75% was β_{2A} . The mixture was resolved into its electrophoretic components by KUNKEL's starch block electrophoresis method⁷.

The macromolecular β_{2M} -globulin of normal serum was consistently found as a contaminant of our preparations, the purest of which were still not completely devoid of it. Dialysis against distilled water at pH 6 to 7 should, however, remove most of the impurity.

IDENTIFICATION

Since β_{2A} -globulin of normal human serum has hitherto not been individualized by any other procedure than immuno-electrophoresis, it follows that any identification has to be based upon this technique. Fig. 1 shows some immuno-electrophoretic graphs, which were made with the aim of proving that our preparations really correspond to the normal β_{2A} serum protein.

1. *Testing of β_{2A} against various antisera* is illustrated in Fig. 1 A, B and C. In each instance, serum from a patient with cirrhosis was used as a reference, since such serum ideally shows the β_{2M} precipitation line. Each slide was developed with both complete anti-human antiserum, and with similar antiserum from which either anti- γ (1A), anti- β_{2M} (1B) or, at least partially, anti- β_{2A} (1C) was removed. For the last-mentioned absorption, the antiserum had been incubated with 1/400 of its volume of serum from a β -myeloma, where the "paraprotein" had previously been found to consist of β_{2A} antigen. The other exhaustions were performed with pure antigens. It is obvious that our preparation consists almost exclusively of β_{2A} antigen. However, a faint β_{2M} line may be distinguished on some preparations corresponding to

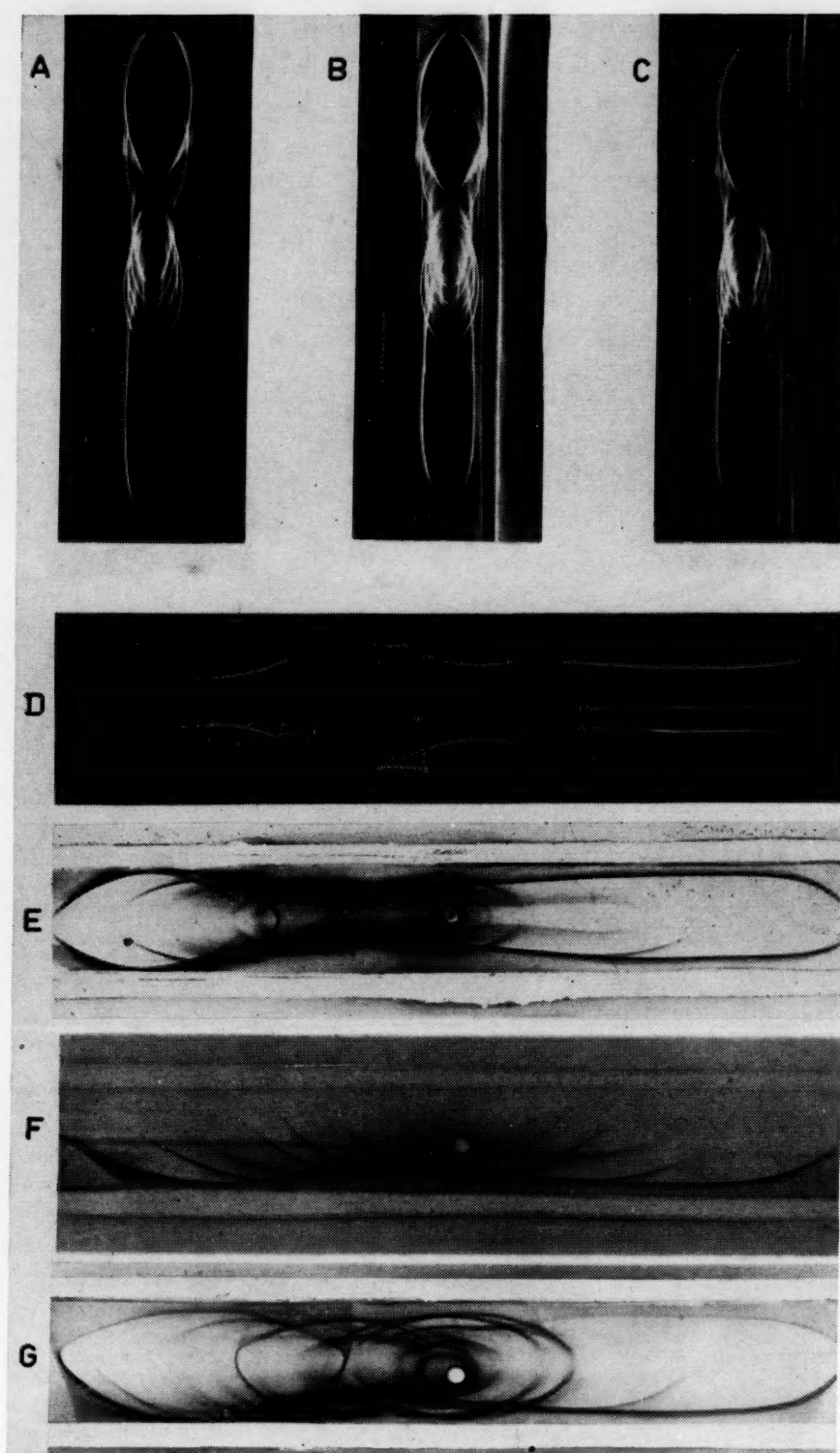


Fig. 1. Immuno-electrophoretic analysis of β_{2A} -globulin, isolated from normal human plasma. A: developed with complete antiserum (left) and with antiserum absorbed with normal γ -globulin (right). The latter still develops the β_{2A} line. B: developed with complete antiserum (left) and with antiserum absorbed with β_2 -macroglobulin (right). The latter still develops the β_{2A} line. C: developed with complete antiserum (left) and with antiserum absorbed with a trace of a myeloma serum of the β_{2A} variety. The β_{2A} line is not developed. D: normal serum (upper tracing) and serum enriched with pure β_{2A} (lower tracing). E: a cirrhosis serum developed with complete antiserum (below) and with antiserum absorbed with isolated β_{2A} (above). The latter fails to develop β_{2A} -globulin. F: a cirrhosis serum developed with complete antiserum, against which a β_{2A} solution was allowed to diffuse from the upper reservoir. A long straight precipitation line prolongs the β_{2A} bow generated by the corresponding serum protein. G: a combination of E and F.

the previously mentioned impurity. In addition, the main β_{2A} precipitation line is always accompanied by a faint secondary curve, which lies in its concavity. This will be discussed later.

2. *Addition of β_{2A} to serum*, as shown in Fig. 1 D, considerably increases the β_{2A} precipitation line of the serum, and causes its displacement towards the antibody reservoir, which indicates excess antigen.

3. *Absorption of a complete antiserum*, by means of our preparation, specifically removed the anti- β_{2A} antibodies without affecting the various other antibodies, as is shown in Fig. 1 E. We consider this a most rigorous test, since even traces of γ -antigen considerably weaken, or even abolish the γ -precipitation line. It is interesting to notice, however, that with preparations showing no visible γ -line upon direct testing with antiserum, the absorption test sometimes weakens the γ -line to a considerable extent. The significance of this phenomenon will be discussed later.

4. *Fusion of the precipitation lines* of serum β_{2A} and of our preparation of β_{2A} constitutes a further proof of their identity. This effect, which is shown in Fig. 1 F, was obtained in the following way. After completion of the electrophoresis of a cirrhotic serum, a long slit running parallel with the migration direction was cut out and filled with a 0.2% β_{2A} solution. Upon diffusing towards the antibody reservoir, the β_{2A} antigen formed a long straight precipitation line, which clearly developed completely into the usual β_{2A} line of serum in the region where the added antigen joined the corresponding protein from the cirrhotic serum. This experiment was of course inspired by the classical Ouchterlony technique which it combined with the electrophoretic separation of the serum antigens.

A somewhat similar experiment is illustrated in Fig. 1 G where cirrhotic serum was developed both by complete antiserum and by antiserum to which a large excess of prepared β_{2A} had been added. Not only was the anti- β_{2A} antibody wholly absorbed, but enough antigen remained in excess to form a new precipitation line, which, as in the previous experiment, joined the β_{2A} line produced by the unabsorbed antiserum.

PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

1. *Electrophoretic mobility*

In the paper electrophoretogram shown in Fig. 2 the relative mobilities of prepared β_{2A} -globulin, commercial γ -globulin (K.A.B.I.), and normal serum proteins can be compared. The β_{2A} clearly lies exactly in the depression between the conventional β - and γ -peaks, and the remarkable obliteration of the normal inter- β - γ depression which characterizes cirrhotic sera must at least partially be ascribed to increased serum β_{2A} levels.

2. *Ultracentrifugation*

The analytical Spinco ultracentrifuge was used for the determination of the sedimentation constant of isolated β_{2A} -globulin. The picture obtained after 27 minutes is shown in Fig. 3. A main component with a sedimentation constant of $S_{20} = 7$ probably corresponds to the normal β_{2A} of human serum. The similarity of this value to the sedimentation constant of normal intact γ -globulin (also 7) is striking, and probably accounts in part for the fact that β_{2A} -globulin so long escaped detection.

However, it was by no means unexpected to us, since it is known that most of the myeloma "paraproteins", even those from β -myelomas, have the same sedimentation constant ($= 7$) as normal γ -globulin⁸.

A second and much less important component has a sedimentation constant of $S_{20} = 10.5$. It is possible, though not proved, that this component corresponds to the accessory precipitation line which usually borders the main curve of immuno-electrophoretic tracings obtained with our preparations. The exact antigenic composition of this line is not yet clear, but it possibly represents some artefact derived from β_{2A} during the fractionation process, such as a polymerized form of the latter protein. A comparable problem also exists for most commercial γ -globulin preparations⁹.

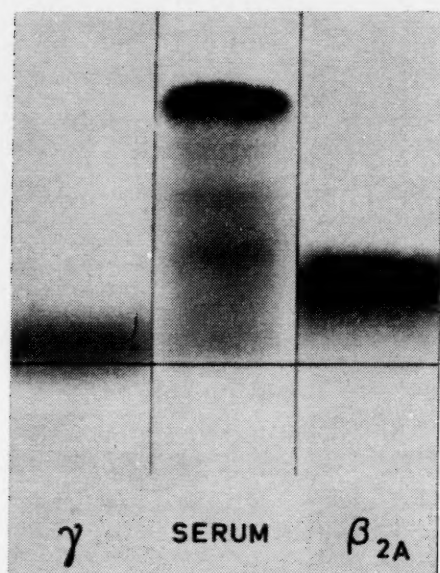


Fig. 2. A comparison of electrophoretic mobilities of γ -globulin, isolated β_{2A} -globulin and serum proteins.

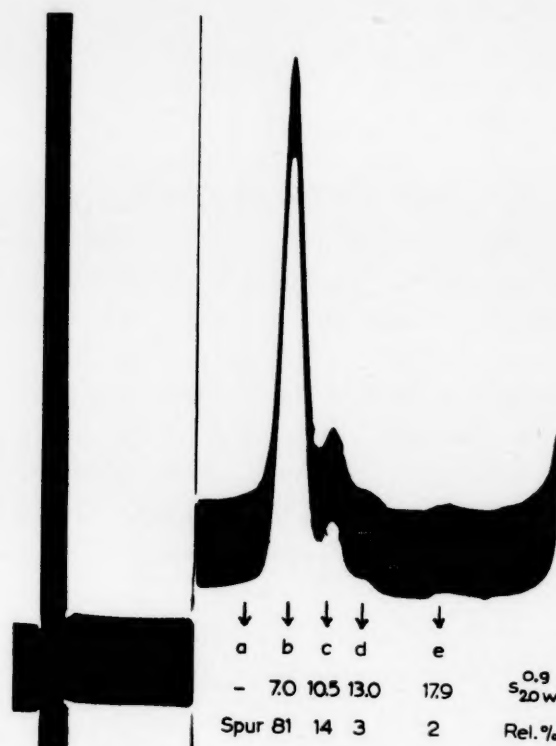


Fig. 3. Ultracentrifuge diagram of isolated β_{2A} -globulin. The major component has a sedimentation constant of about 7 S. An impurity of $S = 17.9$ corresponds to β_2 -macroglobulin.

3. Composition

Only a few preliminary data are given here.

Lipid staining of paper electrophoretograms of β_{2A} failed to reveal any protein-bound fat.

On the other hand, the protein is intensely stained by the periodic-acid-Schiff reagent, which indicates a large carbohydrate content. The following figures should be regarded as first estimates only (on the basis of 100 mg of polypeptide, as determined by the biuret method):

Nitrogen:	16.20 g%
Hexoses (aldoses, as determined by HOLT's anthrone method):	4.90 g%
Hexosamines (as determined by ELSON AND MORGAN's method):	3.74 g%

On the whole, β_{2A} -globulin appears to be rather rich in carbohydrates, as compared to γ -globulin. This again, could have been expected, as it is well known that β -myeloma proteins usually show markedly higher carbohydrate levels than do proteins from γ -myelomas^{10, 11}.

4. Some other properties

β_{2A} -Globulin is precipitated by ammonium sulfate in concentrations between 1.2 and 1.8 *M*.

In the presence of distilled water it behaves as a pseudoglobulin, thus again showing contrast with γ -globulin.

Finally, it is resistant towards precipitation with zinc ions. This has already been mentioned, and has been used as a means of fractionation.

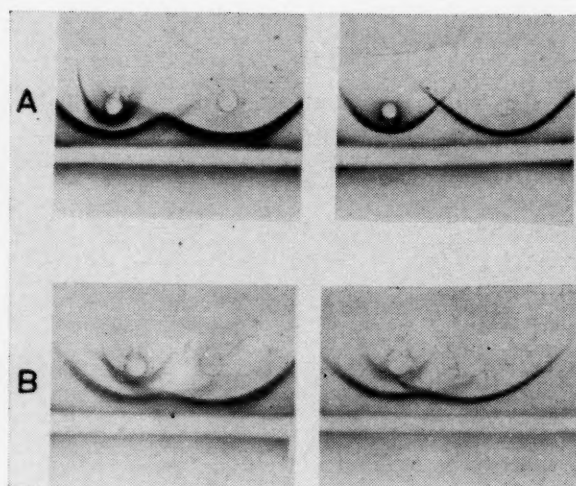


Fig. 4. Antigenic relationships between β_{2A} - and γ -globulins. A: developed with horse antiserum against human serum. B: developed with rabbit antiserum against human serum. The tracings on the left side were obtained with 1 g% protein solutions; those on the right side with 0.5 g% protein solutions. In each tracing the left reservoir contains a β_{2A} preparation, and the right reservoir a γ -globulin solution of corresponding concentration.

ANTIGENIC PROPERTIES

The study of the antigenic properties of our isolated β_{2A} -globulin was considerably hindered by the fact that none of our preparations were absolutely pure, as judged by immunological standards. Therefore no attempt was made to obtain a specific antiserum by immunization of animals with our preparations, as it could be expected that several antibodies would be produced.

Nevertheless complete anti-human antisera provided some useful information concerning the relationship between γ - and β_{2A} -globulins which will be briefly summarized here (Fig. 4).

Fig. 4 A illustrates an experiment where a preparation of β_{2A} and a solution of commercial γ -globulin (K.A.B.I.) diffused against a polyvalent horse anti-human antiserum. The β_{2A} preparation contained a rather large amount of β_{2M} , whose precipitation line is visible near the antigen reservoir. Two different concentrations (1 and 0.5 g% resp.) were used for each antigen. At the point where the main precipitation lines intersect, some fusion apparently occurs. This is clear in the case of the 1% antigen, and is shown by a slight bridging bow in that of the weaker concentration. Each line seems to continue independently in the original direction, although considerably weakened, at least for the 1% antigen experiment. No such weakening is visible for the 0.5% antigen. Both phenomena are again seen when a rabbit anti-

human serum is employed for similar experiments (Fig. 4 B); here the fusion seems to dominate over the independence.

It is tempting to interpret the above findings as indicative of *partial antigenic correspondence*.

Finally it may be of interest to mention that in Fig. 1 F a similar weakening of the β_{2A} -precipitation line can be seen at the point where it crosses the strong gamma curve.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are greatly indebted to Miss C. GILLANT, Miss M. TH. DELCON and to Dr. PH. DUSART for their skilful assistance.

SUMMARY

By a combination of zinc sulfate precipitation, ammonium sulfate precipitation and starch block preparative electrophoresis, β_{2A} -globulin could be obtained from normal human serum and plasma. Immuno-electrophoretic tests showed the preparation to be identical with native β_{2A} serum protein. Its sedimentation constant was found to be $S_{20} = 7$, the same as for γ -globulin. The carbohydrate content of β_{2A} -globulin was determined and found to be much higher than that of γ -globulin; the new protein is therefore classified as a glycoprotein. Some other properties of this protein are mentioned, amongst them a certain immunological relationship with γ -globulin.

REFERENCES

- ¹ C. B. LAURELL, S. LAURELL AND N. SKOOG, *Clin. Chem.*, 2 (1956) 99.
- ² P. GRABAR AND C. A. WILLIAMS JR., *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193.
- ³ G. WALLENIUS, R. TRAUTMAN, H. G. KUNKEL AND E. C. FRANKLIN, *J. Biol. Chem.*, 225 (1957) 253.
- ⁴ P. BURTIN, L. HARTMANN, J. HEREMANS, J. J. SCHEIDEGGER, F. WESTENDORP-BOERMA, R. WIEME, CH. WUNDERLY, R. FAUVERT AND P. GRABAR, *Rev. franç. études clin. biol.*, 2 (1957) 161.
- ⁵ P. GRABAR, R. FAUVERT, P. BURTIN AND L. HARTMANN, *Rev. franç. études clin. biol.*, 1 (1956) 175.
- ⁶ L. L. GRIFFITHS AND V. A. L. BREWS, *J. Clin. Pathol.*, 6 (1953) 187.
- ⁷ H. G. KUNKEL, *Zone Electrophoresis*, in D. GLICK, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. I, Interscience Publ., Inc., New York, 1954, p. 141.
- ⁸ E. L. SMITH, D. M. BROWN, M. L. MCFADDEN, V. BUETTNER-JANUSCH AND B. V. JAGER, *J. Biol. Chem.*, 216 (1955) 601.
- ⁹ H. E. SCHULTZE, *Behringwerke-Mitt.*, 26 (1952) 3.
- ¹⁰ C. B. LAURELL, H. LAURELL AND J. WALDENSTRÖM, *Am. J. Med.*, 22 (1957) 24.
- ¹¹ J. SONNET, L. LOUIS AND J. HEREMANS, *Acta Haematol.*, 14 (1955) 193.

DEVELOPMENT OF FOETAL PROTEINS

JOHN BODMAN *

John Beard Research Institute, Pasadena, Calif. (U.S.A.)

Most sexually mature mammals produce a crop of enlarging follicles during each cycle of ovarian activity, of these many become atretic. While the egg develops in its follicle, external to the mother, it comes to lie in the secreted follicular fluid which, prior to ovulation has gradually increased in volume. It is known that this fluid contains chondroitin sulphate and hyaluronic acid; moreover the follicles which are about to rupture contain a thermolabile substance which seems to act by depolymerising these mucopolysaccharides and in so doing, alters the osmotic pressure leading to rupture of the follicle.

The ovum thus expelled finds its way, surrounded by its corona radiata of follicular cells and some follicular fluid, to either tube and it is at this point that fertilization usually occurs.

The sperm, as well as the ovum, have developed externally to their host, and both have undergone the apparently essential feature of myotic division. It would seem that this development external to the host has led to the curious, but well known, fact that these gonadal cells are regarded by their hosts as antigenic, and injection of sperm leads to antibody production, which antibody, spermicidin, is capable of immobilizing homologous spermatozoa. Be this as it may, the act of ejaculation causes a fully developed sperm, which has hitherto remained quiescent, to become fully motile, but it would seem that the energy for this motility must come from within, since unless chilled, it soon ceases.

Sperms are propelled up the tube by muscular contraction, the function of the tubal cilia being limited to maintaining homogeneity of its contents, fertilization being effected usually in the upper third. It is interesting to notice that unfertilized ova show degeneration when they reach the lower end of the tube, hence, whereas both ova and sperm must be deficient individually in some component which would enable them to live separately in the tube, the fertilized ovum not only lives, but during its tubal descent undergoes cleavage.

It has been shown that the fertilized mammalian ovum can be supported *in vitro* by glucose or mannose, by pyruvate or lactate, but it cannot be so supported by galactose or fructose¹ or by any other carbohydrate tested. The enzyme systems of the sperm have been similarly investigated for mammalian species, and although these vary in proportionate content from animal to animal, they present a common picture in their high proportion of β -glucuronidase, β -glucosidase, mannosidase and *n*-acetyl glucosaminidase². We know that a certain minimal sperm count is necessary to ensure successful fertilization and pregnancy, and it has been suggested that this is necessary to ensure that a sperm meets an ovum. However, an ovum can find its way from one ovary to the opposite tube across the peritoneum, and once in the tube

* Present address: 99, Harley Street, London, W.1.

both ovum and sperm are guided by ciliary action to lie centrally, so it might be that "fifty million" sperm are required, not for fertilization or the hazard of a rendezvous, but to supply enzymes to break down tubal contents to afford energy supply for the dividing fertilized ovum.

During the 8-10 days of tubal descent not only has cleavage begun, but specialized cells have been developed whose function it will be to secure nidation in the uterus by erosion and invasion of its lining, and then to pass to the developing embryo such supplies as are necessary to energize and support its growth. Not only do these remarkable trophoblast cells secure nidation and assist placentation, but they are believed to form the first proteins necessary for the developing embryo and in addition to furnish hormones. It is therefore apparent that at nidation the trophoblast (cytotrophoblast) is adult tissue, sufficient for its purpose.

But while the changes we have been considering have been taking place in the ovum, it must be remembered that the endometrium has prepared itself to receive the newcomer. HUGHES³ has very rightly stressed this important fact, which is often forgotten, and indeed without which adequate nidation may not take place. The endometrium has become soft, spongy and congested; we might say easy to invade, but apart from these morphological changes which have taken place according to the time schedule of the individual species, the endometrium has begun to depolymerize its stored glycogen, so that glucose is available. An endocrine "wound" has been made, and the body meets this circumstance as ever, by the influx of glucose, and depolymerization of surrounding polysaccharides. In this case, the "wound" has been anticipated, and glycogen has been stored in readiness.

"A gonadotropic hormone" states AREY⁴ "begins to be formed by the trophoblast by nine days, even while the blastocyst is implanting in the uterine lining."

This gonadotropin (c.g.h.) is a galactose containing glycoprotein which is excreted by the (human) mother in the urine in increasing quantities during the first seven weeks of gestation, the titre rapidly falling thereafter. "The time range matches the growth, flowering and decline of the cellular trophoblast,"⁴ "there is good evidence that this tissue is the actual source of the hormone".

The evidence which has been presented to support this universally held contention is based on threefold experimental facts,

(a) tissue culture of placental elements⁵ gives rise to the appearance of c.g.h. in the culture fluid,

(b) implantation of placental elements in the anterior chamber of the rabbits eye gives rise to c.g.h.⁶,

(c) the overgrowth of cytotrophoblast—chorionepithelioma—is accompanied *sometimes* by urinary secretion of c.g.h., or, the persistent presence of cytotrophoblastic elements in the uterus—hydatidiform mole—is accompanied by excretion of c.g.h.

The question then remains, whence does the early cytotrophoblast get the galactose to incorporate in its c.g.h.?

In the mammalian ovum, as I have described above, there is no evidence that galactose can be metabolized. Before nidation, the endometrium depolymerizes polysaccharide to glucose to support the growing embryo, and, meanwhile, the early placenta stores galactogen. At one time it was thought that this was a reserve against a subsequent need for milk formation, but I think that galactogen is stored firstly,

because the early embryo cannot use it, and secondly because that galactose is about to be needed.

There are certain systems in the body in which galactose, or amino sugars containing galactose, are essential and it might be fruitful to think briefly of three of these, in terms of gestational time. I can only quote three, as time forbids a longer discussion,

- (a) the lens of the eye,
- (b) the blood groups,
- (c) the mesenchymal tissues such as cartilage.

These make their appearance about the ninth week.

Further we must remember that the entry of galactose into a cell is conditioned largely by the presence of insulin, for example the anterior chamber of the eye *in vivo*, or the lens *in vitro* cannot get galactose if insulin is absent (*vide*^{7, 8}).

The question then arises, does this system cross the placental barrier, or is it inherited?

It will be remembered that galactosaemia is a disease occurring in the new born, and the symptoms thereof are the symptoms of accumulated and unusable galactose; further, this disease is heterozygous in type. The galactokinase-galactowaldenase (Gk-Gw) system must therefore be gene inherited, and this system is not passed across the placental barrier. Further, the galactosaemic infant may develop cataract, and further, in such cataractous lens, accumulated galactose is found¹¹. It is interesting to think of diabetic cataract, because, as I have said, in the absence of insulin, the lens is denied galactose.

If we reconsider the experimental evidence for the production of c.g.h. by cytotrophoblast we shall see that in every case, cytotrophoblast has produced c.g.h. in contact with adult tissue—even in tissue culture.

But there is a further point. It has been shown that c.g.h. has been fractionated¹² by protamine precipitation, and that the resulting product is a pure glycoprotein by electrophoresis in the Tiselius apparatus, and that intravenous injection of this purified product does not show luteinising action in women. I have been able to examine this preparation and find it galactose free, which finding is confirmed^{13, 14}.

Direct experimental evidence is lacking for man, but it has been shown¹⁵ that UDPGA* is lacking in certain animal placental homogenates and in livers of early foetal guinea pigs, the level rising considerably at full term**.

The antigenicity of placental polysaccharides has been studied¹⁶ and the evidence is suggestive that these polysaccharides are antigenically distinct in pregnancy toxæmia. Further evidence has been offered on different grounds¹⁷ that c.g.h. produced in the later months of pregnancy is not identical with that produced in the first trimester.

The evidence is very suggestive, at least, that the truth is contained in the quotation⁴ that c.g.h. is formed "even while the blastocyst is implanting", in that, contact with the human endometrium, with its adult Gk-Gw enzyme system furnishes the opportunity for providing the trophoblast precursor with the necessary galactose.

* UDPGA = Uridine diphosphate glucuronic acid.

** P-Gal transferase and uridine diphosphate galactose pyrophosphorylase activities are strikingly lower in foetal and neonatal rat liver than in the adult organ²⁷.

As I have said before, the present opinion is that the trophoblast has an additional duty, that is, of providing the first protein for the developing embryo. If so, according to our line of reasoning, this should not contain galactose. The first autonomous protein known is fetuin, first described by PEDERSEN¹⁸ and later described in greater detail by DEUTSCH¹⁹. It is an acid glycoprotein containing mannose and glucosamine, separated in the ultracentrifuge with difficulty from albumen, and having an electrophoretic mobility similar with that of the α -glycoproteins²⁰. It comprises up to 45% of calf-serum proteins up to mid-term, but at birth, the serum concentration has fallen to and will fall steadily thereafter about 20%. It has been found in human foetal serum in the first trimester only.

I am indebted to Dr. PIERCE of the Institute of Animal Physiology, Babraham, for a specimen of fetuin. Antiserum has been prepared thereto from rabbits. This specimen was prepared from full-term calf serum, and was found to contain galactose. In all my experiments this fetuin was found to have electrophoretic mobility on acetate media comparable with that of the α_2 -globulins, and immuno-electrophoresis carried out with calf serum gave a line comparable with the α_2 -position. Immuno-electrophoresis carried out similarly with serum from a pregnant cow, shows clearly two lines limited to the α_2 and inter- α_2 - α_1 region.

KEY TO THE FIGURES 1, 2 AND 3

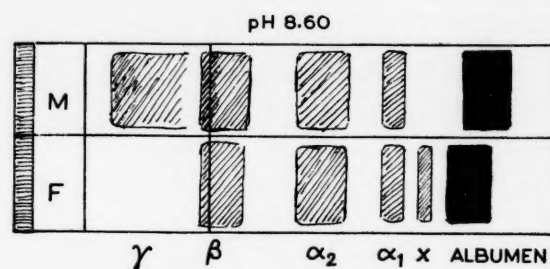
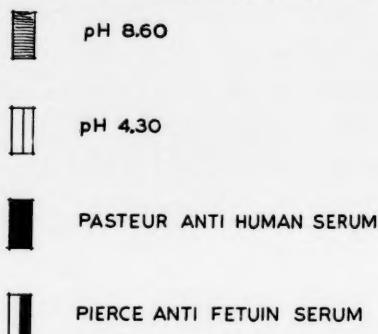


Fig. 1. Electrophoresis of material serum together with foetal serum (age 11 weeks) on cellulose acetate in barbitone-acetate buffer pH 8.6. Dried at 80°, fixed in ethanol stained first in Ponceau Red in 3% trichloroacetic acid, cleared in 1% acetic acid and restained overnight in dilute nigrosine (0.05 mg% in 2% acetic acid). Fetuin is not coagulated by heat, and is soluble in 10% trichloroacetic acid. — Note the absence of γ -globulins in the foetal blood and the presence of the X-protein band described by BERGSTRAND AND CZAR.

BERGSTRAND AND CZAR²¹ published their observations of foetal sera from human sources together with that of homologous maternal serum and show clearly that the electrophoretic separation at pH 8.6 shows in the foetal serum only a separate component migrating between the albumen and the α -proteins. This component is not present after the fourth month of gestation²². This I have confirmed. The same authors²³ have examined this X-component in greater detail and conclude from their studies in the ultracentrifuge that this may be related to the fetuin found in early bovine foetal serum.

In the cow there are virtually no circulating gonadotropins, and hence no test such as the Aschheim Zondek, Friedmann or Xenopus can give a diagnosis of pregnancy. As I have described above, immunological investigation of serum proteins after electrophoresis with the antibody prepared from galactose-containing fetuin (Dr. PIERCE) consistently gives one or more lines in the α_2 or inter- α regions, as does

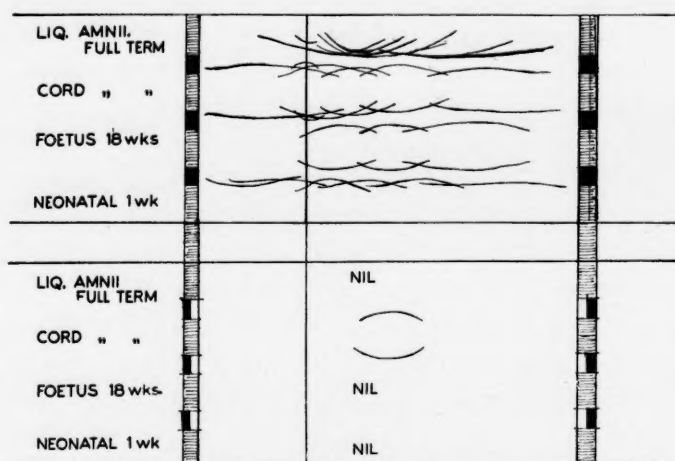


Fig. 2. Immuno-electrophoresis of proteins associated with foetal fluids. Electrophoresis first carried out on cellulose acetate strips 10×2.5 cm, which are then split longitudinally, half being placed in 2% cleared agar on a lantern slide which will thus take four strips at once. Dried slides stained with Masson or Light Green. — Note the line given by cord serum proteins in the presence of the fetuin antibody described in the text; this has been repeatedly observed. Note the complexities of protein structure of the liquor amnii, concentrated by dialysis, and the absence of γ -globulins; and the appearance of a γ -globulin one week after birth in a foetal/neonatal serum.

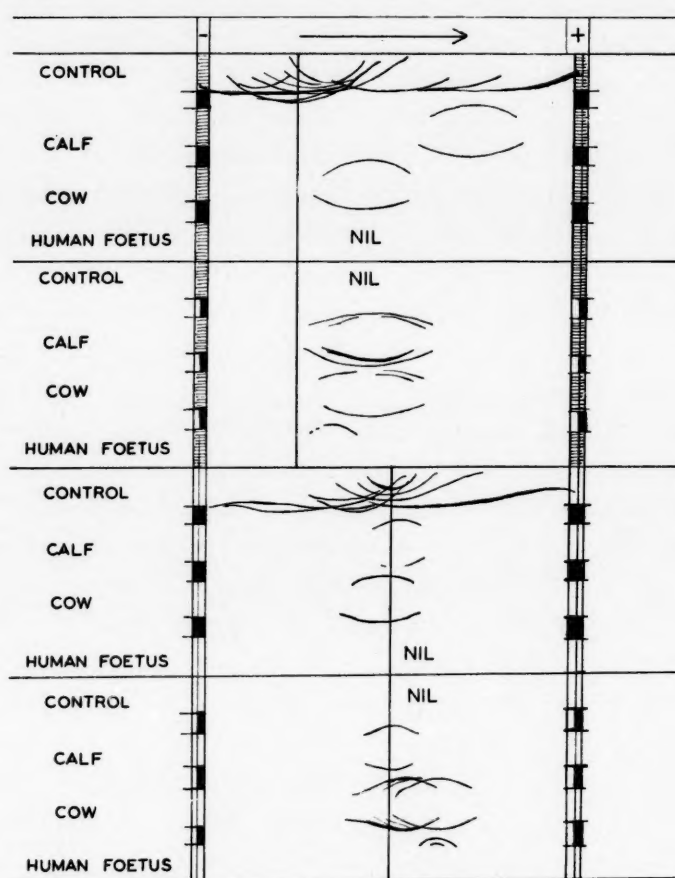


Fig. 3. Immuno-electrophoresis as above to compare cow and calf serum (the latter obtained at birth). Both cow and calf serum are known to contain fetuin. Maternal and human foetal serum are shown as controls, in this case, the foetal serum has given a line with the fetuin antibody (aged 18 weeks). — These experiments were duplicated at pH 4.3. This clearly demonstrates an unsuspected flaw in this technique, for at this pH, the albumens should be isoelectric, and only the M.1 and M.2 should move to the anode. This is precisely what happens on paper strips, as I have already shown²⁶. The explanation is that the acetate carries so little buffer, and the run has to be made in a very high humidity, that the applied serum "buffers the buffer". This requires further investigation.

the antibody with the antigen when added to homologous serum. It is pertinent to ask where the galactose containing c.g.h. would migrate under similar conditions. This has been described²⁴ during investigation of this glycoprotein which was excreted in huge quantities in the case of a hydatidiform mole, and was shown to be in the α_2 or inter- α region. These authors also record abnormality in the carbohydrate content of the fraction which gave the highest hormone titre.

Figs. 2 and 3 show actual immuno-electrophoretic pictures which have been prepared by carrying out electrophoresis either on cellulose acetate or paper at pH 8.6 in barbitone-acetate buffer, and then transferring a portion of the strip thus obtained on to agar which has been gelled on a lantern slide. About 1 cm away, antibody has been applied on a strip of paper 1 mm wide, and, after the reaction has taken place the agar has been dried, the whole plate stained and mounted. This elegant technique does away with the preparation of photographic lantern slides.

These slides will show that the anti-fetuin antibody will give a precipitin reaction with human cord blood, and with maternal blood taken in the 10th-16th week, but does not react with the X-component of BERGSTRAND; the reacting line will be seen in the α_2 or inter- α region.

We have not considered the liquor amnii. This is essentially a foetal secretion and has been shown by many workers²⁵ not to contain galactose during the first half of pregnancy, but may contain fractional amounts at term. The total protein content is normally about 500 mg%, but this can easily be concentrated by dialysis against 10% polyvidone, the fluid being placed in a Visking dialysis tube. It is absolutely essential that this should be repeatedly washed for at least a week before use, to get rid of contained sulphur. After such concentration immuno-electrophoresis has been carried out using Pasteur anti-human serum and the slides will show the protein pattern and the absence of γ -globulins. Reaction has been obtained with the anti-fetuin serum, again in the α_2 region.

In conclusion I would suggest that the evidence suggests that initially fetuin does not contain galactose, that after the fourth month in human foetal development, the fetuin system does contain galactose, and that this fetuin now has an altered mobility. It may well be that fetuin is a common biological protein in its initial galactose-free stage. As FISHER *et al.*²⁰ have described, the fetuin with α_1 mobility has a spreading effect on cells in tissue culture, and this is more effective than an adult α_1 glycoprotein. It is known that sugars have a hardening effect on protein gels—both Kodak and Ansco have developed techniques of adding pentose to gelatine films for this purpose.

ACKNOWLEDGEMENT

I have to acknowledge with gratitude many months of assistance afforded by the Sister in charge of the Midwifery Department of the Hillingdon Hospital.

SUMMARY

Prior to ovulation, the follicular fluid is known to undergo depolymerization. After fertilisation, the descending ovum must derive energy for cell division and growth from follicular fluid and tubal contents, which are acted upon by its own

enzymes and those of the spermatozoa present in the tube. The mammalian ovum can be supported *in vitro* by glucose or mannose, pyruvate or lactate. It cannot be supported by fructose, galactose or other sugars. During tubal descent, the endometrium has been conditioned to receive the ovum, and its glycogen stores have been depolymerized to glucose. At nidation, the adult trophoblast invades the endometrium and is responsible for placentation. It also furnishes the initial protein for the developing embryo and secretes hormones for endometrial support. The first autonomous protein known is fetuin, a glycoprotein which contains no galactose. All the available evidence shows that the earliest hormone secreted cannot contain galactose. Chorionic gonadotropin must, therefore, be synthesized from a trophoblastic precursor by adult tissue containing the Waldenase enzymes. Fetuin and anti fetuin sera have been prepared and investigated by immuno-electrophoresis.

REFERENCES

- ¹ W. K. WHITTEN, *Nature*, 179 (1957) 1081.
- ² J. CONCHIE AND T. MANN, *Nature*, 179 (1957) 1190.
- ³ E. C. HUGHES, *Trans. V Am. Congr. Obstet. Gynecol.*, 1952.
- ⁴ L. B. AREY *Developmental Anatomy*, Saunders, London, 1956.
- ⁵ S. E. S. JONES, S. O. GEY AND M. K. GEY, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 77 (1943) 26.
- ⁶ H. L. STEWART, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 61 (1951) 990.
- ⁷ W. C. STADIE, *Physiol. Revs.*, 34 (1954) 52.
- ⁸ E. J. ROSS, *Nature*, 171 (1953) 125.
- ⁹ P. W. KENT, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, Suppl. 31 (1957) 166.
- ¹⁰ L. F. LELOIR, *Advances in Enzymol.*, 14 (1953) 153.
- ¹¹ V. SCHWARZ, L. GOLDBERG, G. M. KOMROWER AND A. HOLZEL, *Biochem. J.*, 62 (1956) 34.
- ¹² L. CLAESSON, B. HÖGBERG, TH. ROSENBERG AND A. WESTMAN, *Acta Endocrinol.*, 1 (1948) 18.
- ¹³ R. F. MILTON, Personal communication.
- ¹⁴ B. HOGBERG, Personal communication.
- ¹⁵ C. G. GREIG, *Biochem. Soc.*, 363rd Meeting, 1957.
- ¹⁶ M. KAKU, *J. Obstet. Gynecol. Brit. Empire*, 60 (1953) 148.
- ¹⁷ J. S. LATTA AND C. R. BEBER, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 74 (1957) 109.
- ¹⁸ K. O. PEDERSEN, *Nature*, 154 (1944) 575.
- ¹⁹ H. F. DEUTSCH, *J. Biol. Chem.* 208 (1954) 669.
- ²⁰ H. W. FISHER, T. T. PUCK AND G. SATO, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 44 (1958) 4.
- ²¹ C. G. BERGSTRAND AND B. CZAR, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 8 (1956) 174.
- ²² C. G. BERGSTRAND, Personal communication (1957).
- ²³ C. G. BERGSTRAND AND B. CZAR, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 9 (1957) 277.
- ²⁴ J. STERNBERG, G. J. STREAM AND M. M. GELFAND, *Clin. Chem.*, 2 (1956) 265.
- ²⁵ A. W. MAKEPEACE, F. FREMONT-SMITH, M. E. PAILEY AND M. P. CARROL, *Surg. Gynecol. and Obstet.*, 53 (1931) 635.
- ²⁶ J. BODMAN, *Rheumatism*, 13 (1957) 25.
- ²⁷ K. J. ISSELBACHER, *Science*, 126 (1957) 652.

ÉTUDE DU PASSAGE DE LA γ -GLOBULINE MARQUÉE À TRAVERS LE PLACENTA HUMAIN

R. MARTIN DU PAN, P. WENGER, S. KOECHLI, J.-J. SCHEIDEGGER ET J. ROUX

Genève (Suisse)

L'étude des *protéines sériques* du fœtus et du nouveau-né nous fait penser que le nouveau-né, et à plus forte raison le fœtus, ne fabriquent pas de γ -globuline^{1, 2}.

Voici tout d'abord deux observations qui parlent en faveur de cette thèse:

Fig. 1 définit l'apparition des différentes protéines sériques pendant la vie fœtale, telles que l'on peut les mettre en évidence par l'immuno-électrophorèse^{3, 4}. Elle montre la brusque apparition de la γ -globuline au 3ème mois de la vie fœtale, ou au moment où le placenta devient perméable. Parmi les autres protéines sériques, certaines sont déjà présentes à ce stade, alors que d'autres n'apparaîtront qu'au cours des mois suivants.

Fig. 2 démontre le taux des différentes protéines sériques à la naissance et pendant les premiers mois de la vie. Le taux de l'albumine, des α - et β -globulines, plus ou moins élevé à la naissance, augmente pendant les premiers mois de la vie, alors que celui de la γ -globuline, généralement supérieur chez le nouveau-né à celui de sa mère, descend pendant les 2 premiers mois de sa vie. Or, un calcul a démontré que cette baisse correspond à la vie des γ -globulines⁵. Vraisemblablement, le nourrisson n'en fabrique donc pas pendant le premier mois de sa vie⁶.

Lorsque nous avons publié cette figure, il y a environ 10 ans, avec MOORE⁶, nous avons émis l'hypothèse que le taux de la γ -globuline du nouveau-né était vraisemblablement dû au passage de la γ -globuline maternelle à travers le placenta. Il nous a fallu attendre la possibilité de marquer les protéines avec de l'iode radioactif pour valider cette théorie et c'est ce que nous désirons faire ici.

Nos recherches sont le fruit de la collaboration de trois chimistes, d'un physicien, d'un histologiste et de deux gynécologues. Elles ont pu être poursuivies grâce à l'autorisation du Professeur DE WATTEWILL, Directeur de la Maternité de Genève et du Professeur BAMATTER, que nous remercions pour leur compréhension.

RECHERCHES

Ces recherches ont passé par 3 phases.

I. Injection de γ -globuline marquée par voie i.m.

Comme on recommande d'administrer la γ -globuline par voie intramusculaire⁷, nous avons injecté, par cette voie, de la γ -globuline marquée à l'iode radioactif à 3 adultes, dont une femme enceinte et à 6 enfants âgés de 2 à 4 ans.

Fig. 3 donne un résumé des déterminations pratiquées chez les adultes et 3 enfants.

Au point d'injection, le taux de la γ -globuline injectée, déterminée grâce à l'iode radioactif fixé, baisse plus ou moins lentement suivant les sujets. Chez la femme enceinte (B) et un des adultes légèrement obèse (Ro), il baisse lentement, puisqu'au bout

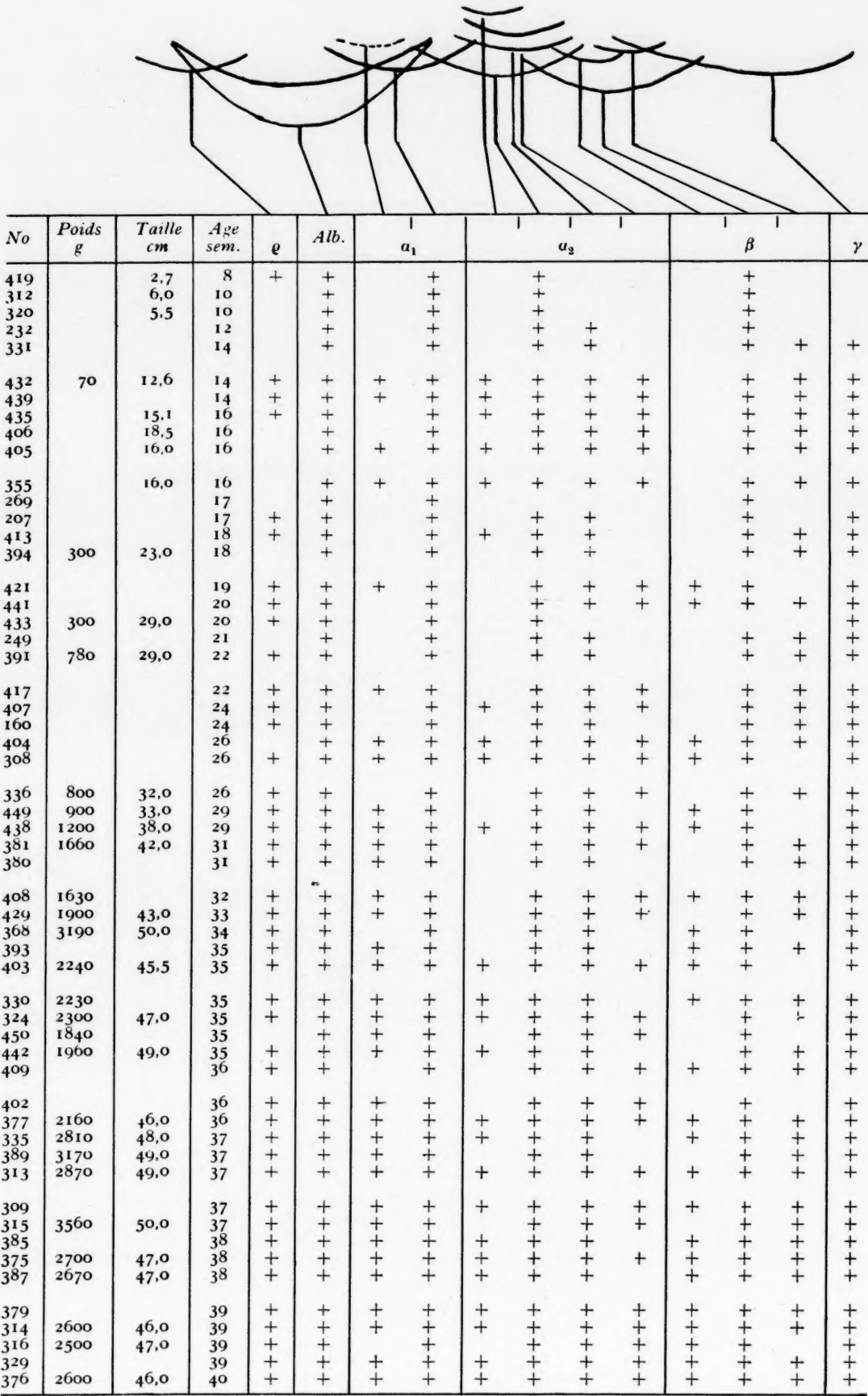


Fig. 1. D'après SCHEIDEGGER, MARTIN ET RIOTTON³

de 1 jour, il reste encore près de 70% de la γ -globuline, et au bout de 4 jours, encore 40 à 60%.

En revanche, chez un adulte maigre (K) et chez les enfants (R, G, S), la γ -globuline quitte rapidement le lieu d'injection; cependant, il reste encore au bout de 1 jour près de 50% de la dose injectée et, au bout de 2 jours, entre 30 et 40%.

Dans le sérum, le taux de la γ -globuline injectée reste généralement bas, puisque les valeurs indiquées ici représentent le pourcentage de la γ -globuline injectée contenue dans la totalité du sérum sanguin.

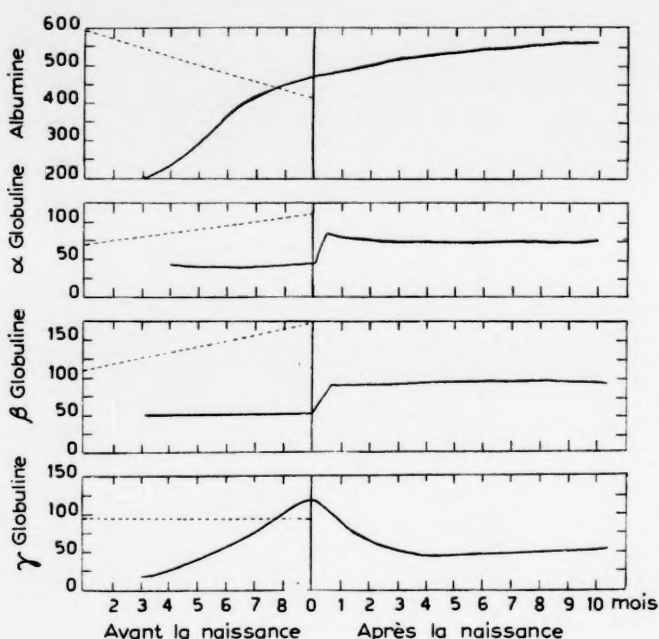


Fig. 2. D'après MOORE, MARTIN DU PAN ET BUXTON⁶
Unités planimétriques

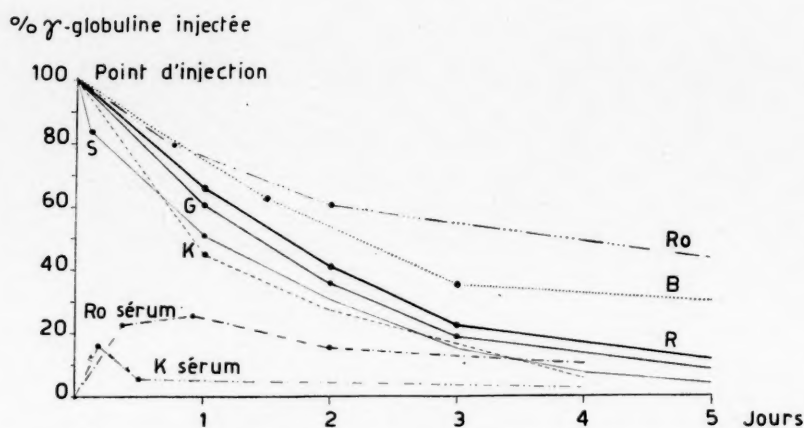
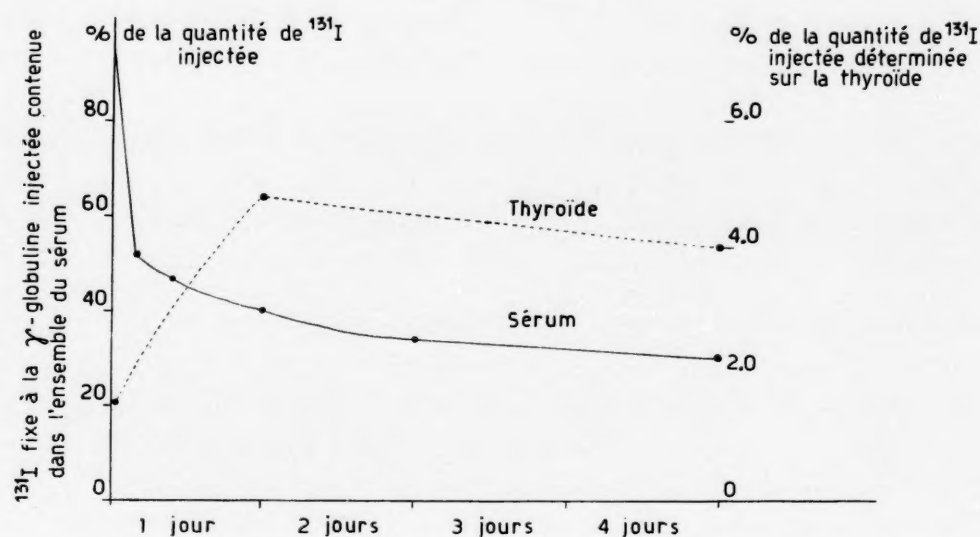


Fig. 3. Injection intramusculaire de γ -globuline marquée à l'¹³¹I.

Que se passe-t-il dans les tissus? Un bilan a montré que, 24 h après l'administration de la γ -globuline, le 10% seulement de cette globuline se trouve dans les tissus et, 48 h après, le 35% chez le sujet qui l'a le mieux résorbée.

Ces résultats expliquent l'inefficacité de certaines thérapies par la γ -globuline administrée en dose trop faible et pourquoi BARANDUM et ses collaborateurs⁸ durent injecter par voie i.m. de fortes doses de γ -globuline pour obtenir une action thérapeutique chez des sujets souffrant de graves infections microbiennes.

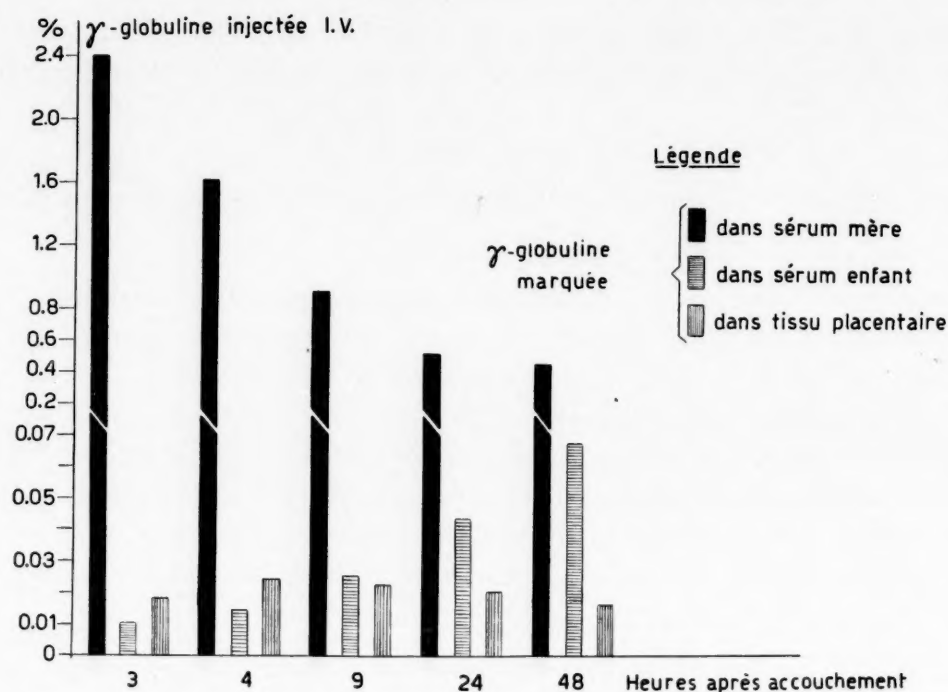
Fig. 4. Injection intraveineuse de γ -globuline marquée à l' ^{131}I .

Ils expliquent aussi pourquoi le taux de la γ -globuline marquée étant très bas dans le sérum de la femme enceinte (B), nous n'en avons trouvé que des traces dans le sang du cordon de son enfant.

II. Injection de γ -globuline marquée par voie i.v.

Nos recherches passèrent alors par une seconde phase au cours de laquelle la γ -globuline marquée fut injectée par voie intraveineuse. Entretemps d'ailleurs, d'autres auteurs avaient pratiqué ces injections délicates sans accident⁹.

Fig. 4 montre les résultats obtenus chez un des adultes soumis à l'injection intraveineuse. Le taux de la γ -globuline injectée par voie i.v. baisse rapidement dans le sang pendant les 5 premières heures qui suivent l'injection; on peut en déduire que cette protide quitte facilement la circulation, puisque, une fois l'équilibre établi entre la circulation et les tissus, le taux baisse beaucoup plus lentement.

Fig. 5. γ -Globuline injectée par voie intraveineuse à des femmes enceintes.

Ces deux séries d'expériences ainsi que celles que nous avons pratiquées encore, avec le sérum anti- γ -globuline fluorescent, nous permettent de tirer les conclusions suivantes:

1. La γ -globuline est capable de passer des tissus dans la circulation puisque, injectée dans le muscle, elle se retrouve dans le sang;
2. La γ -globuline passe de la circulation dans les tissus puisque, injectée par voie intraveineuse, elle disparaît de la circulation et se retrouve dans les organes¹⁰.

III. Injection de γ -globuline marquée à des femmes enceintes

Une fois ces données bien établies, notre hypothèse du passage de la γ -globuline de la circulation maternelle dans la circulation foetale, devait trouver sa confirmation. Nous avons injecté par voie intraveineuse de la γ -globuline marquée à l'iode radio-actif à 12 femmes enceintes, quelques heures avant l'accouchement.

La γ -globuline injectée a toujours traversé la barrière placentaire, sauf chez une femme atteinte de toxicose.

Fig. 5 rassemble les résultats obtenus pour 5 femmes chez lesquelles les déterminations furent faites quantitativement avec l'appareil Geiger scintillant.

Pour chaque cas, la première colonne indique le pourcentage de la γ -globuline injectée, contenue dans 100 c.c. de sérum de la mère au moment de l'accouchement, la 2ème colonne ce même pourcentage dans le sang du cordon ombilical et la 3ème colonne dans le tissu placentaire.

Cette figure permet de tirer les conclusions suivantes:

- a) *La γ -globuline traverse rapidement la barrière placentaire* puisque, déjà 3 h après son injection, on la retrouve, non seulement dans le tissu placentaire, mais aussi dans le sang du cordon.
- b) *La γ -globuline n'a pas tendance à s'accumuler dans le placenta* puisque, au bout de 48 h, sa concentration dans le sang du cordon est nettement supérieure à celle du tissu placentaire.
- c) *Le taux de la γ -globuline injectée ne s'équilibre que lentement entre la circulation maternelle et la circulation foetale* puisque, 48 h après l'injection, il y a encore 5 fois plus de γ -globuline marquée dans le sang de la mère que dans celui de son enfant.

CONCLUSIONS

Quelles conclusions pratiques pouvons-nous tirer de ces recherches?

A) *Tout d'abord dans le traitement par la γ -globuline:*

Comme nous l'avons vu, la γ -globuline injectée par voie intramusculaire ne quitte que lentement le point d'injection, ce qui n'est pas étonnant vu qu'il s'agit d'une protéine.

Si l'on veut utiliser la γ -globuline à titre préventif, il faudra donc l'administrer le plus tôt possible après la contamination. A titre thérapeutique, il convient d'injecter de fortes doses à plusieurs endroits ou éventuellement, en cas d'urgence, d'utiliser la voie intraveineuse avec toutes les précautions requises. Quinze fois, en effet, nous avons injecté, sans inconvénient, de la γ -globuline diluée par voie intraveineuse.

B) *Dans la protection du nouveau-né:*

On sait depuis fort longtemps que l'enfant vient au monde avec une protection immunitaire transmise par sa mère¹¹. Des hypothèses ont été émises concernant cette

acquisition. Nous pensons que notre étude, au moyen de la γ -globuline marquée, confirme l'hypothèse du passage des *anticorps* à travers le placenta, sans décomposition préalable¹¹. Elle pose, en revanche, la question de l'arrêt de la γ -globuline par un placenta du type plus complexe que celui de l'homme. On peut, en effet, se demander pourquoi ces molécules traversent facilement 2 couches de cellules comme chez l'homme et pas plus; il doit sans doute s'agir, chez les ruminants par exemple, de facteurs cellulaires spécifiques. Mais comme pédiatres, c'est le nourrisson qui nous intéresse surtout. Nous laisserons donc le petit veau au vétérinaire et les animaux de laboratoire au physiologiste.

RÉSUMÉ

Le marquage de la γ -globuline par l'¹³¹I selon la méthode de Prexmann fixe suffisamment bien l'iode pour permettre une étude de la γ -globuline injectée dans l'organisme, en dosant l'iode radioactif. D'autre part, l'autographie des analyses immuno-électrophorétiques a montré que la γ -globuline porteuse d'iode radioactif n'a pas subi de modifications de structure pouvant entraîner la perte de ses déterminants antigéniques. Forts de ces données, nous avons étudié le passage de la γ -globuline marquée à travers le placenta humain. Douze femmes enceintes reçurent par voie intraveineuse de la γ -globuline marquée, 2 heures à 48 heures avant l'accouchement. A une exception près, (toxémie gravidique), la γ -globuline traversa le placenta. La traversée fut rapide; mais le taux de la γ -globuline injectée ne s'équilibra que lentement entre la circulation maternelle et foetale.

SUMMARY

THE PASSAGE OF LABELLED γ -GLOBULIN THROUGH THE HUMAN PLACENTA

When γ -globulin is labelled with ¹³¹I according to the method of Prexmann, the iodine is sufficiently firmly attached to the γ -globulin to allow the latter to be traced after it has been injected into the organism, by estimating the radioactive iodine. Moreover, autoradiography of immuno-electrophoretic analyses have shown that labelling of γ -globulin with radioactive iodine does not cause structural modifications that lead to loss of antigenic determinants. On the basis of these data, we have studied the passage of the labelled γ -globulin through the human placenta. Twelve pregnant women were given labelled γ -globulin intravenously, from two to forty-eight hours before parturition. Except for one case (gestational toxemia) the γ -globulin passed through the placenta. The passage was rapid, but equilibrium of the total injected γ -globulin was only slowly established between the maternal and foetal circulation.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. MARTIN DU PAN, *Contribution à l'étude des relations entre l'âge et l'immunité pendant la jeunesse*, Éd. Karger, Bâle, 1952.
- ² R. MARTIN DU PAN, J.-J. SCHEIDEGGER ET H. ROULET, *Arch. franç. pédiat.*, X (1953) No. 10.
- ³ J.-J. SCHEIDEGGER, E. MARTIN ET G. RIOTTON, *Schweiz. med. Wochschr.*, 86 (1956) 224.
- ⁴ J.-J. SCHEIDEGGER ET R. MARTIN DU PAN, *Études néo-natales*, VI (1957) No. 3.
- ⁵ ORLANDINI, SASS-KORKSAK ET EBBS, *Pediatrics*, 16 (1955) 575.
- ⁶ D. MOORE, R. MARTIN DU PAN ET C. L. BUXTON, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 57 (1949) 312.
- ⁷ C. A. JANEWAY, *Centre International de l'Enfance*, Paris, 1955.
- ⁸ S. BARANDUM, R. KIPFER, G. RIVA ET A. NICOLET, *Schweiz. med. Wochschr.*, 7 (1957) 155.
- ⁹ N. LANG, G. SCHETTLER ET R. WILDHACK, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 856.
- ¹⁰ C. A. JANEWAY ET D. GITLIN, *Advances in Pediat.*, IX (1957) 65.
- ¹¹ B. VAHLQUIST, *Études néo-natales*, I (1952) No. 2.

IMMUNOELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN AM MENSCHLICHEN SPERMAPLASMA

G. HERMANN

Medizinische Klinik der Universität des Saarlandes Homburg/Saar (Deutschland)*

Unter Spermaplasma (SP) versteht man das von Spermien freizentrifugierte Ejakulat. Diese Flüssigkeit enthält Eiweisse in ziemlich variabler Konzentration von etwa 4–7 g% und stellt ein Gemisch der Sekrete von Testis, Nebenhoden, Samenblasen und Prostata dar. Die ersten chemischen und physikochemischen Untersuchungen wurden schon Ende des vorigen Jahrhunderts durchgeführt, aber bis heute ist noch recht wenig über die Art dieser Eiweisskörper, und praktisch nichts über ihre Funktion bekannt.

Mit der Entwicklung der elektrophoretischen Methoden zur Trennung von Eiweisskörpern, konnte dann mehrfach nachgewiesen werden, dass sich die Eiweisse des SP, ebenso wie die Serumproteine in mehrere Fraktionen auftrennen lassen. Es wurden bisher Makroelektrophoresen, Mikroelektrophoresen (mit dem Gerät nach ANTWEILER¹) und Papierelektrophoresen des SP durchgeführt, die jedoch weder über die Zahl der abtrennbaren Fraktionen, noch in der Bezeichnung der einzelnen Kurven Gipfel, noch über die Art dieser Eiweisskörper eine Übereinstimmung erbrachten.

Bei den makroelektrophoretischen Untersuchungen ergaben sich methodische Schwierigkeiten, weil die SP-Mengen sehr gering waren und weil im SP etwa 60% (nach MANN²) Eiweisskörper vorhanden sind, die durch Zellulosemembranen dialysabel sind. Da eine Dialyse aus methodischen Gründen notwendig war, konnten nur die Eiweisse im undialysierbaren Anteil des SP untersucht werden.

Aus der übersichtlichen Zusammenstellung der Makro- und Mikroelektrophoretischen Untersuchungsergebnisse ist folgendes erwähnenswert:

GRAY UND HUGGINS³ fanden 4 Fraktionen, welche die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie die Serumproteine zeigten und nahmen deshalb eine Identität zwischen diesen SP-Eiweissfraktionen und den Albuminen, α -, β - und γ -Globulinen des Serums an.

ROSS, MOORE UND MILLER⁴ konnten ebenfalls 4 und eine inkonstante fünfte Fraktion unterscheiden. Zusätzliche chemische Untersuchungen liessen den Schluss zu, dass P 1 eine nicht hitzecoagulierbare Proteose ist. P 2 und P 3 enthielten je einen wasserunlöslichen Globulinanteil und eine wasserlösliche Fraktion von gleicher Wanderungsgeschwindigkeit; ein Identität mit Serumglobulinen wurde jedoch nicht angenommen. P 4 wurde als Glucoprotein erkannt. Albumin konnte weniger als 0.02% gefunden werden, jedoch war wegen der geringen Menge eine Zuordnung zu einer der beiden schnellstwandernden Fraktionen nicht möglich. Obwohl P 4 und der inkonstante P 5 "etwa wie Albumin wanderten", glaubten ROSS, MILLER, MOORE UND SIKORSKI⁵ nach Fällungsversuchen mit Essigsäure ausschliessen zu können, dass

* Direktor: Prof. Dr. F. DOENECKE.

P 5 trotz gleicher Wanderungsgeschwindigkeit wie Serumalbumin ($M = 6.4$) ein Albumin sei.

Die Elektrophorese des Bullen-SP zeigt grosse Unterschiede zum Pherogramm des menschlichen SP. LARSON UND SALISBURY⁶ fanden 11 Fraktionen und schrieben den Fraktionen 10 und 11 "Albumincharakteristik" zu.

Die mikroelektrophoretischen Untersuchungen von SCHÄFER⁷ mit dem Gerät von ANTWEILER¹ unterscheiden sich dem Prinzip nach nicht von den vorhergehenden, jedoch waren infolge der kürzeren Dialysedauer und der kleineren Materialmenge die Versuchsbedingungen schon wesentlich günstiger. Anfänglich wurden mangelhaft reproduzierbare Kurven mit 8 Gipfeln gefunden. Mit abgewandelter Technik liessen sich dann 5-gipfelige Kurven konstant darstellen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Ross und Mitarb. wurden P 1 als Proteose (Pepton, Histon), die nach 14-stündiger Dialyse verschwand, P 4 und P 5 als Mucoproteide erkannt, womit nach Ansicht des Autors der Albumincharakter dieser beiden Fraktionen festgelegt war. Eine Identität von P 2 und P 3 mit Serumglobulinen wurde nicht angenommen.

Die rasche Aufarbeitung undialysierten SP's wurde erst durch die Papierelektrophorese möglich; die Ergebnisse sind ebenfalls schematisch dargestellt.

OBÉ UND HERMANN⁸ fanden 6 bzw. 8 Fraktionen, wobei 3 undeutlich getrennte Z-Fraktionen und eine N-Fraktion im γ -Bereich und weiter kathodisch lagen. Zahlreiche Untersuchungen ergaben, dass die SP-Eiweissfraktionen keineswegs konstant gleichschnell wie die Serumproteine wanderten, weshalb an einer Identität der Eiweisse gezweifelt wurde. SCHNEIDER, NOWAKOWSKI UND VOIGT⁹ erhielten nach 48-stündigem Stehenlassen des SP konstant reproduzierbare Pherogramme mit 6 Fraktionen (0 bis 5); 4 Banden verhielten sich elektrophoretisch auch im Mischelektropherogramm wie Serumglobuline, die Banden 1, 2 und 3 enthielten Glykoproteide, Lipoproteide fehlten, 1 kathodisch wanderndes Protein blieb unberücksichtigt. Zur Frage der Identität von SP- und Serumeiweissen haben sich die Autoren nicht festgelegt, obwohl SCHIRREN¹⁰, der nach der gleichen Methode arbeitete, die Fraktionen mit A, α , β , γ und 0 bezeichnete. KEUTEL UND GABSCH¹¹ fanden 3 anodisch und 3 kathodisch wandernde Fraktionen, die J-Fraktion lag in der Auftragestelle, und stellten eine Verschiebung der Fraktionen zur Kathode beim Stehenlassen fest. Eine Zuordnung der Fraktionen und der Vergleich der einzelnen Papierelektrophoresen ist wegen unterschiedlicher Techniken (verschiedene Auftragestellen, verschiedene Färbungen, verschiedene Apparaturen) recht schwierig. Eine quantitative Auswertung der SP-Pherogramme ist jedoch nicht berechtigt, solange die Identität der SP-Eiweisse mit den Serumeiweissen nicht feststeht, denn die Fragen der FarbadSORPTION, der Geradlinigkeit der Eichkurven u.a. sind für SP bis heute nicht untersucht.

Nach unserer eigenen Erfahrung waren trotz weitgehender Variation der Versuchsbedingungen (Papier, Voltzahl, Stromstärke) die Papierelektrophoresen des SP recht unbefriedigend. Übereinstimmend wurden aber bei allen PE-Untersuchungen Veränderungen der SP-Eiweisse beim Stehenlassen innerhalb der ersten 48 Stunden festgestellt.

Zur Klärung der ungelösten, jedoch – wie gezeigt – vieldiskutierten Frage, ob die Fraktionen des SP mit den Serumeiweissfraktionen identisch sind und ob überhaupt im SP Eiweisse vorkommen, die auch im Serum enthalten sind, gingen wir von folgenden Voraussetzungen aus.

Ein serumidentisches Eiweiss im SP muss konstant gleich schnell wandern, wie

diese Fraktion im Serum, d.h. nach physikalischen Eigenschaften übereinstimmen. Weiterhin müssen alle Eiweisse des SP, die mit Eiweissen des Serums identisch sind, mit einem Antihumanserum Präzipitate bilden. Dagegen sind die SP-Eiweisse, die mit Antihumanserum nicht präzipitieren auch bei übereinstimmender Wanderungsgeschwindigkeit nicht identisch. Dadurch wird die Art der Eiweisskörper gleichzeitig durch ihre immunologischen Eigenschaften festgelegt.

Eine weitere Identitätsprüfung ist dann durch Absättigungsversuche gegeben. Wird ein Antiserum, das Antikörper gegen alle Serumeiweisskomponenten besitzt, mit SP-Eiweissen versetzt, so werden alle Antikörper, die mit SP-Eiweissen reagieren können, abgebunden und fallen aus. Wenn ein solches abgesättigtes Antiserum später gegen ein SP ausgewertet wird, so dürfen theoretisch keine Präzipitate mehr ausfallen. Bei einer Auswertung gegen ein Humanserum müssen diejenigen Präzipitatlinien fehlen, deren zugehörige Antikörper bereits durch die entsprechenden serumidentischen Eiweisse des SP abgebunden worden sind.

Zur Beantwortung der gestellten Frage war, also die Immunelektrophorese nach GRABAR UND WILLIAMS^{12, 13} in besonderen Masse geeignet, da sie beide Prinzipien in einem Arbeitsgang vereint.

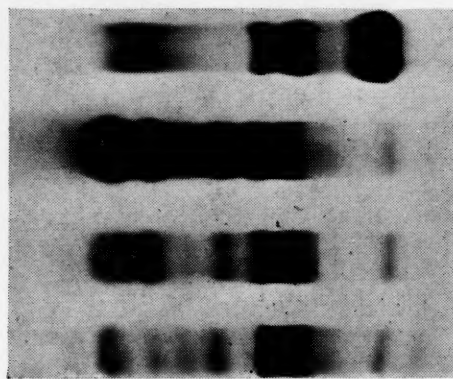


Fig. 1. Mit Amidoschwarz 10 B gefärbte SP-Elektrophoresen. Es sind unterschiedliche Mengen von SP, 0.2, 0.3, und 0.5 ml von oben nach unten aufgetragen. Als Vergleich lief ein normales Serum.

MATERIAL UND METHODIK

Normale, frisch gewonnene Ejakulate gesunder Personen wurden bis zur Verflüssigung bei Zimmertemperatur aufbewahrt, dann wurden die Spermien abzentrifugiert, das SP mikroskopisch auf Spermienfreiheit kontrolliert und innerhalb von 90 min zur Elektrophorese angesetzt. Zum Nachweis der Veränderungen beim Stehenlassen blieb das SP entsprechend lange im Eisschrank bei 4° C. Die Elektrophorese wurde nach der Originalmethode von GRABAR UND WILLIAMS¹² durchgeführt. Im Agar-Gel in Veronal-Salzsäure-Puffer wurde bei pH 8.2 und Ionenstärke $I = 0.05$ während 3 Stunden bei etwa 60 mA und 120 V das SP getrennt. Färbung mit Aminoschwarz 10 B oder Azokarmin in wässriger Lösung. Aus den seitlichen Gräben liess man nach Auftrennung der Fraktionen Pferdeserum, das alle Antikörper gegen Humanserum enthielt (Institut Pasteur, Paris) mehrere Tage bis zu 3 Wochen eindiffundieren. Das Antigen-Antikörperverhältnis wurde weitgehend variiert. Bei den Absättigungsversuchen wurden 1 ml Antihumanserum und 0.5 ml SP gemischt, im

Eisschrank 3 Tage aufbewahrt, abzentrifugiert, und der Überstand gegen Humanserum und SP ausgewertet. Als Kontrolle diente Antihumanserum mit 0.5 ml phys. Kochsalzlösung. Alle Versuche wurden mit 2 verschiedenen Antiseren durchgeführt.

ERGEBNISSE

Agarelektrophorese

Die Fig. 1 zeigt eine gefärbte Agarelektrophorese eines Serums und eines SP in 3 verschiedenen Konzentrationen. Die Fraktionen sind viel deutlicher und schärfer, als bei allen anderen Methoden getrennt. Es lassen sich 7-9, evtl. 10 Fraktionen erkennen. Konstant vorhanden sind A, P 1, P 2, P 3, P 4, P 5 und ein "tail". P 6 und P 7 sind nicht immer deutlich getrennt. Beim Stehenlassen verändern sich besonders die Fraktionen P 5-P 8 (Fig. 2). Anfänglich ist bei P 5 eine mengenmässig

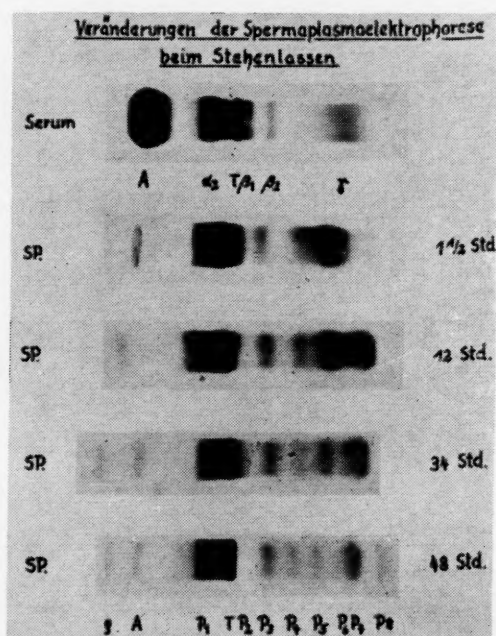


Fig. 2. Veränderungen der SP-Elektrophorese beim Stehenlassen. Vergleiche Text: Man erkennt gut die Veränderungen in den Proteosefraktionen und das Auftreten der Vorfraction nach 34 bzw. 48 Stunden. T = Auftragestelle, P = Kurvengipfel.

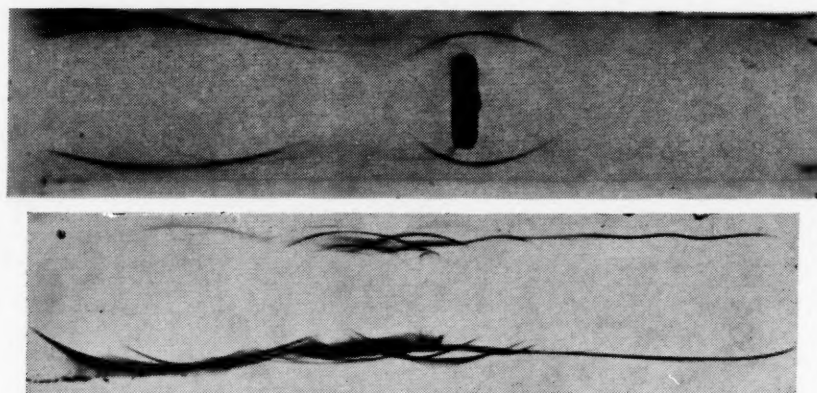


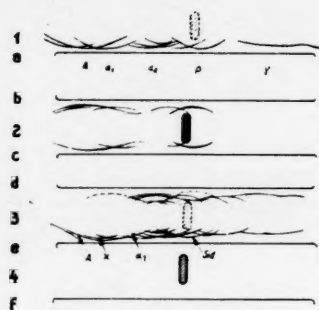
Fig. 3a (oben) und 3b (unten). Bei der Diffusion von Antihumanserum gegen elektrophoretisch getrenntes SP sind 4 Präzipitatinien und fraglich eine X-Linie entstanden. Bei der Diffusion von Antihumanserum gegen Normalserum sind alle Linien vorhanden, während im Absättigungsversuch (gegenüber) Albumin, X-Linie und Siderophylin-Linie fehlen, α_1 ist stark verwaschen.

starke Fraktionen vorhanden, dann scheinen sich P 6 und P 7 und später auch P 8 zu entwickeln und weiter kathodenwärts zu wandern, wobei immer die vorhergehenden Fraktionen zu Gunsten der nächstfolgenden abnehmen. Nach 24 Stunden zeichnet sich häufig eine schwach angefärbte Vorfraktion ab, die schneller als A wandert (ρ).

Die Zuordnung der SP-Fraktionen nach ihrer Wanderungsgeschwindigkeit zu den Serumfraktionen geht aus den Abbildungen 1 und 2 hervor.

Immunoelktrophorese

Zum Vergleich wird nochmals eine einzelne Agarelektrophorese eines normalen SP gezeigt. Beim Fällungsversuch gegen Antihumanserum ist nur die mit gleicher Geschwindigkeit wie Serumalbumin wandernde Fraktion konstant ausgefallen. Die Albuminlinie war teilweise gedoppelt (X-Fraktion?). Eine weniger deutliche, gelegentlich gedoppelte Linie ist mehrfach zwischen den Fraktionen A und P 1 des SP aufgetreten. Sie muss in den Bereich der α -1-Globuline des Serums verlegt werden, obwohl auch im Serum bei der Agarelektrophorese α -1 selten deutlich ist. Angedeutet sind 1-2 Linien im Bereich der SP-Fraktion P 1 sichtbar. Eine, nur selten gedoppelte,



Immunoelktrophorese

Die Elektrophoresen sind mit 1-4, die Diffusionsgräben mit a-f bezeichnet.

- 1 Humanserum normal 0,05 ml
- 2 Spermaplasma normal
- 3 Humanserum normal
- 4 Spermaplasma

Antihumanserum vom Pferd (Institut Pasteur, Paris)

Verdünnung in a = 1:2, in b = 1:8, in c = 1:16, in e unverdünnt 0,75 ml.

Antihumanserum mit Spermaplasma abgesättigt in d und f.

Fig. 4. Schematische Darstellung der Ergebnisse der Immunoelktrophorese des Spermaplasmas.

sehr deutliche Präzipitationslinie ist innerhalb der P 2 Fraktion des SP aufgetreten, die ebensoschnell wie die β -1-Globuline des Serums wandert. Der Scheitelpunkt des Präzipitationsrings lag stets kathodenwärts von der Auftragestelle.

Wenn es sich um spezifische Präzipitationen handelte, musste nun der Absättigungsversuch das Ergebnis bestätigen; d.h. bei Testung des abgesättigten Antiserums gegen normales Humanserum mussten die entsprechenden Linien fehlen.

Es wird vergleichend nochmals eine normale gefärbte Agarelektrophorese eines Humanserums gezeigt (Figs. 1 u. 2).

Im normalen Humanserum wurden von der normalen Antiserumkontrolle (Fig. 3 b) folgende Komponenten ausgefällt: 1 Albuminlinie; 1 X-Linie; 1 α -1-Linie;

5 α -2-Linien, 4 β -1-Linien; 1 β -2-Linie und 1 langgezogene γ -Linie. Diese Linien stimmten nach Lage und Aussehen völlig mit einem vom Institut Pasteur Paris zum Antiserum mitgelieferten photokopierten Bild einer Immunoelktrophorese überein.

Das mit SP abgesättigte Antiserum fällte noch folgende Komponenten im Humanserum: 1 α -1-Linie, aber stark verwaschen; 5 α -2-Linien; 3 β -1-Linien, gelegentlich ist die 4. Linie noch ganz verwaschen angedeutet; 1 β -2-Linie und die γ -Linie. Es fehlen: A, α 1, X, 1 β -1-Linie.

Im γ -Bereich waren nur ganz selten sehr schwache Präzipitationen vorhanden, im Erschöpfungsversuch blieben die γ -Globuline unverändert.

Erwartungsgemäss ist bei der Diffusion des abgesättigten Antihumanserums gegen SP keine Präzipitation mehr aufgetreten.

Eine schematischen Übersicht der immunoelktrophoretischen Ergebnisse gibt die Fig. 4.

Dialyseversuche von SP während 48 Stunden ergaben eine meist deutliche Verminderung der Fraktionen P 5, P 6 und P 7 in der dialysierten Probe gegenüber dem undialysierten SP. Nach Ultrafiltration des SP war die Biuretprobe im Filtrat positiv, nach der elktrophoretischen Auftrennung lagen schwach gefärbte Banden dieser ultrafiltrablen "Eiweisse" im γ -Bereich.

Bei der Mucoproteidfärbung hat sich A, wohl wegen der geringen Mengen im normalen SP nicht, aber in einem pathologisch veränderten SP schwach angefärbt. Stark gefärbt war P 1 und eine schwache Anfärbung zeigte die Bande P 7*.

DISKUSSION

Wir können nun also folgendes aussagen:

Zur Untersuchung der Eiweisse des SP ist die Agarelektrophorese besonders gut geeignet, da die Fraktionen viel schärfer und besser getrennt sind. Es lassen sich bis zu 10 Fraktionen gut darstellen (Fig. 1). Im SP wurde eine Fraktion ϕ nachgewiesen, die schneller als Serumalbumin wandert. Konstant ist Serumalbumin im SP vorhanden (Fraktion A), das mit Antihumanserum Präzipitate bildet und im Absättigungsversuch fehlt. Bestätigt wird dies durch die Versuche von Ross¹⁴, der gewissermassen genau den umgekehrten Weg eingeschlagen hat. Er erzeugte durch Injektion von SP Antikörper beim Kaninchen und fand, dass dieses Antiserum auch mit Serumalbumin Präzipitate bildete. Mit anderen Worten kann dies jetzt so ausgedrückt werden, dass Ross mit dem im SP vorhandenen Serumalbumin ein Antihumanalbumin erzeugte, das selbstverständlich mit dem Serumalbumin präzipitierte.

Immunologisch ist im SP ein α -1-Globulin vorhanden, das sich färberisch bei der Agarelektrophorese nicht darstellt. Es ist wohl nicht ganz konstant vorhanden, aber wohl mit dem α -1-Globulin des Serums identisch. Infolge der geringen Menge dieser Fraktion ist die α -1-Linie im Absättigungsversuch nicht ganz verschwunden, sondern nur stark verwaschen.

Eine Identität der α -2-Fraktion des Serums mit der P 1 Fraktion des SP muss man wohl ablehnen, da sich im Absättigungsversuch die 5 α -2-Ringe unverändert darstellen. Die Präzipitationen im P 1 des SP mit Antihumanserum werden wahrscheinlich durch 1-2 Eiweisskörper verursacht, die nur eine oberflächliche Verwandtschaft zu den α -2-Globulinen des Serums aufweisen. P 1 enthält Mucoproteide.

* Herrn Prof. Dr. P. GRABAR und Madame E. PERNOT, Institut Pasteur, Paris, danken wir bestens für Ihre liebenswürdige Unterstützung bei der Durchführung der Mucoproteidfärbung.

P 2 enthält 1 serumidentisches Eiweiss, das nicht ganz konstant einen scharfen Präzipitationsring bildet. Im Absättigungsversuch wird nur eine der 4 β -I-Komponenten des Serums praktisch erschöpft, die 3 anderen bleiben unverändert. Dieses im P 2 enthaltene Eiweiss entspricht mit grosser Wahrscheinlichkeit dem metallaffinen Siderophylin, wie ein eingehender Vergleich mit einem dem Antiserum beigelegten Reaktionsschema ergab. Die Präzipitationslinie entspricht nach Lage und Form den von GRABAR¹⁵ für das Siderophylin beschriebenen Kriterien.

Die SP-Fractionen P 5 bis P 8 sind mit Serumeiweissen weder verwandt noch identisch. Den selten auftretenden sehr schwachen Präzipitationen messen wir keine sichere Bedeutung bei und auch im Absättigungsversuch bleiben die γ -Globuline unverändert. P 5, P 6, P 7, und möglicherweise auch P 8 bestehen zum grössten Teil wohl aus den sog. Proteosen, wie sich aus den Ultrafiltrations- und Dialyseversuchen ergibt. P 7 scheint eine geringe Menge Mucoproteide zu enthalten. Dieser Befund stimmt auch mit den Untersuchungen von ROSS und Mitarb. und SCHÄFER überein, nur dass sich die Proteosen bei der Agarelektrophorese in mehrere Fraktionen auftrennen lassen.

Auf die einzigen immunoelektrophoretischen Untersuchungen am SP des Meerschweinchens von PERNOT¹⁶ sei noch ganz besonders hingewiesen, jedoch weichen die Pherogramme des Meerschweinchen-SP von denen des Menschen erheblich ab, sodass ein unmittelbarer Vergleich nicht möglich erscheint.

Über eine klinische Anwendung der Agarelektrophorese des menschlichen SP können wir noch keine Aussagen machen, jedoch ist noch zu erwähnen, dass in einigen Versuchen krankhaft veränderte SP auch von der Norm abweichende Pherogramme ergaben*.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach einem einleitenden Vergleich früherer Makro- und papierelektrophoretischer Untersuchungen soll gezeigt werden, dass sich menschliches Spermaplasma (SP) durch Agarelektrophorese besser und deutlicher auftrennen lässt. In frischem Zustand sind im allgemeinen 8, nach 32–48 stündigem Stehenlassen bis zu 10 Fraktionen darstellbar. Eine Fraktion wandert konstant gleichschnell wie die Serumalbumine und wird im Kreuzversuch mit Antihumanserum ausgefällt. Diese Fraktion ist also immunologisch und elektrophoretisch mit Serumalbumin identisch. Vor dem Albumin konnte eine Vorfraktion nachgewiesen werden. Im Bereich der α - und β -Globuline entstehen beim SP teils inkonstante, teils unscharfe Präzipitationsringe. Teilfraktionen des SP könnten deshalb mit Serumglobulinen identisch sein, P₂ enthält wohl Siderophylin. Im γ -Bereich und weiter kathodenwärts liegen 3 bzw. 4 Fraktionen die mit Antihumanserum nur selten ganz schwache Präzipitationen geben. Eine Identität mit γ -Globulinen ist deshalb nicht wahrscheinlich. Der überwiegende Anteil dieser 3 bzw. 4 Banden dürfte, da sie teilweise ultrafiltrabel sind, aus Proteosen bestehen.

SUMMARY

IMMUNO-ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF HUMAN SPERM PLASMA

After reviewing earlier macro-analytical and paper-electrophoretic analytical methods, a better and clearer method is shown for the separation of human sperm

* Die Untersuchungen wurden in der Urologischen Klinik der Universität des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. C. E. Aken) und im Institut für Mikrobiologie und Hygiene in Homburg/Saar durchgeführt (vergleiche ¹⁷ und ¹⁸).

plasma (SP) by means of agar-electrophoresis. Fresh plasma can generally be split up into 8 fractions, while after 32–48 h standing, up to 10 fractions can be distinguished. One fraction migrates with the same constant speed as serum albumins and is precipitated in a cross-check with human anti-serum. This fraction is also immunologically and electrophoretically identical with serum albumin. A fraction was found to run before the albumin fraction. In the range of the α - and β -globulins, the SP shows precipitation rings that are partly unstable and partly not sharply outlined. It is possible therefore that some fractions of SP are actually serum globulins. In the γ -region and beyond it towards the cathode, 3 or 4 fractions are found which very occasionally give very weak precipitates with human antiserum, and therefore they are probably not identical with γ -globulins. As these fractions are partly ultrafiltrable, these 3 or 4 bands presumably contain mostly proteoses.

LITERATUR

- ¹ H. J. ANTWEILER, *Kolloid. Z.*, 115 (1949) 130.
- ² T. MANN, *The Biochemistry of Semen*, Methuen & Co., London und J. Wiley & Sons, Inc., New York, 1954, S. 111.
- ³ S. GRAY UND CH. HUGGINS, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 50 (1942) 351.
- ⁴ V. ROSS, D. H. MOORE UND E. G. MILLER, *J. Biol. Chem.*, 144 (1942) 667.
- ⁵ V. ROSS, E. G. MILLER, D. H. MOORE UND H. SIKORSKI, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 53 (1943) 179.
- ⁶ B. L. LARSON UND C. W. SALISBURY, *J. Biol. Chem.*, 206 (1954) 2 : 741.
- ⁷ F. SCHÄFER, *Diss. med.*, Bonn, 1953.
- ⁸ G. OBÉ UND G. HERMANN, *Z. Urol.*, 47 (1954) 7 : 393.
- ⁹ W. SCHNEIDER, H. NOWAKOWSKI UND K. D. VOIGT, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 35/36 : 863.
- ¹⁰ C. SCHIRREN, 4. *Symposion d. Deut. Ges. f. Endokrinol.*, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1957, S. 92.
- ¹¹ H. J. KEUTEL UND H. CH. GABSCH, im Druck.
- ¹² P. GRABAR UND C. A. WILLIAMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193, 17 (1955) 67.
- ¹³ P. GRABAR, *Behringwerke Mitteilungen*, N. G. Elwert, Marburg/Lahn, 1955, H. 30.
- ¹⁴ V. ROSS, *J. Immunol.*, 52 (1946) 1 : 87.
- ¹⁵ P. GRABAR, *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, Sér. A II Chimica (Volume jubilaire du Prof. Virtanen), S. 401.
- ¹⁶ E. PERNOT, *Bull. soc. chim. biol.*, 38 (1956) 1041.
- ¹⁷ G. HERMANN, W. LICHT, H. J. KEUTEL UND E. KRUG, *Naturwiss.*, 45 (1958) 268.
- ¹⁸ G. HERMANN, W. LICHT, H. J. KEUTEL UND E. KRUG, *Z. exptl. Med.*, 1958, im Druck.

ELECTROPHORETIC PROTEIN AND POLYSACCHARIDE PATTERNS
IN TUBERCULOSIS AND AMYLOIDOSIS

T. ARONSSON, A. GRÖNWALL AND E. LAUSING

Department of Clinical Chemistry, University Hospital, Uppsala (Sweden)

This investigation of the electrophoretic protein and polysaccharide patterns in tuberculosis and amyloidosis is based on certain modifications of the technique for paper electrophoresis. Thus ARONSSON AND GRÖNWALL¹ have recently shown that the electrophoretic separation on paper can be improved in such a way that the number of components or zones is increased from the usual 6 to 9. This was made possible by a new buffer containing Tris, EDTA and Boric acid, called TEB-buffer. Our continued work has now resulted in a separation into 12 components. This was achieved through the following modifications of the technique. Instead of ordinary paper, we used strips of cellulose acetate "Oxoid"², 30 cm long, which allow about 22 cm migration of the albumin front. The voltage gradient was increased to 6.0 V/cm and the running time to 20 h.

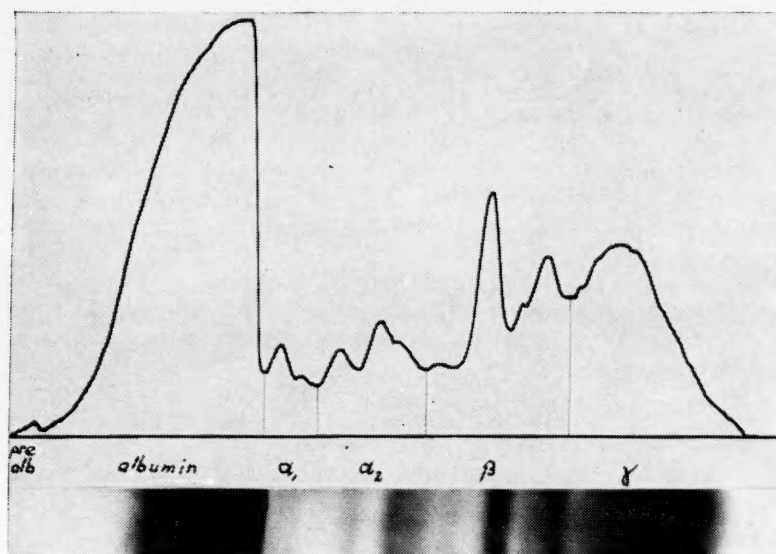


Fig. 1. Electrophoretic separation of normal human serum.

Fig. 1 shows an example of the separation of a normal serum by this method. The strip was stained for proteins with amido black 10 B according to GRASSMAN, HANNIG AND KNEDEL³ and the diagram evaluated with Spinco's Analytrol. A study of how the new components are related to the conventional ones is in progress. However, it seems as if the following had occurred. Albumin separated into pre-albumin and one main component. α_1 -Globulin was split into two components and α_2 -globulin into three. There are 4 β -components altogether, while γ -globulin shows no obvious signs of splitting. Although a few of the components did not come out very well in the diagram, they correspond to real zones on the strip.

The PAS-method for staining protein-bound polysaccharide according to KÖRW AND GRÖNWALL⁴ has also been modified. This method has been observed to present certain disadvantages. First, the paper itself is sometimes too strongly stained, giving too dark a background for the photometric evaluation of the strip, and second, the albumin zone may also take on too much stain. We have tried to avoid this by altering various steps of the procedure. However, this will not be discussed, since we have found that these disadvantages are best avoided by using cellulose acetate paper. The modified method is the following.

METHOD FOR STAINING PROTEIN-BOUND POLYSACCHARIDE IN CELLULOSE ACETATE STRIPS

1. Dry the cellulose acetate strip and fix in 70% ethanol.
2. Wash carefully in water in order to eliminate the TEB-buffer.
3. Place in 0.5% periodic acid for 5 min.
4. Rinse carefully with distilled water.
5. Place in 0.25% fuchsin and 0.25% thionyl chloride in aqueous solution until maximum colour has developed.
6. Rinse in 0.25% thionyl chloride.
7. Rinse in water and dry.

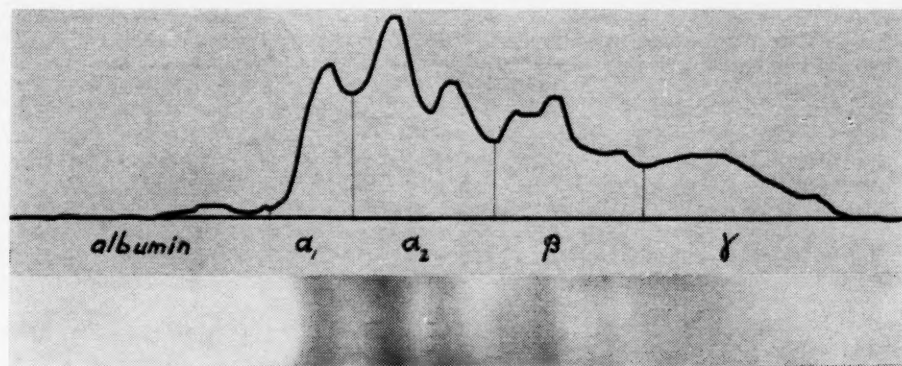


Fig. 2. PAS-staining of normal human serum according to KÖRW AND GRÖNWALL

Fig. 2 shows a polysaccharide stain of a normal serum. There is a very low carbohydrate content in the albumin zone and most carbohydrate is in the α - and β -regions especially in the first α_2 - and in the second β -components.

These two methods were used for analysing a number of blood sera from cases of tuberculosis and of tuberculosis complicated with amyloidosis.

It is well-known that the electrophoretic protein pattern is changed in these two diseases and that there is also an increased concentration of the serum polysaccharides. The electrophoretic protein changes are known to be unspecific and to consist of decreased albumin, and increased α - and γ -globulin fractions. Against this, it is less well-known how the increase of polysaccharide is distributed over the electrophoretic components.

We have considered it to be of interest to apply our modified methods for protein and carbohydrate staining to investigate whether any specific protein changes appeared in cases of tuberculosis complicated with amyloidosis.

DISCUSSION

We wish to premise that our methodological work was pursued parallel with the clinical investigations and therefore the latest improvements were not yet applied in all cases.

Our material included 60 normal individuals, 70 cases of tuberculosis and 8 cases of tuberculosis with verified amyloidosis. The cases of tuberculosis were divided into two groups having polysaccharide values below or above 200 mg% respectively, which, however, cannot be discussed here in detail.

Fig. 3 shows a protein and a polysaccharide diagram plotted for a typical case of amyloidosis. In the protein diagram, albumin is low and the first α_2 - and γ -globulins are increased. The polysaccharide diagram shows that the increase of polysaccha-

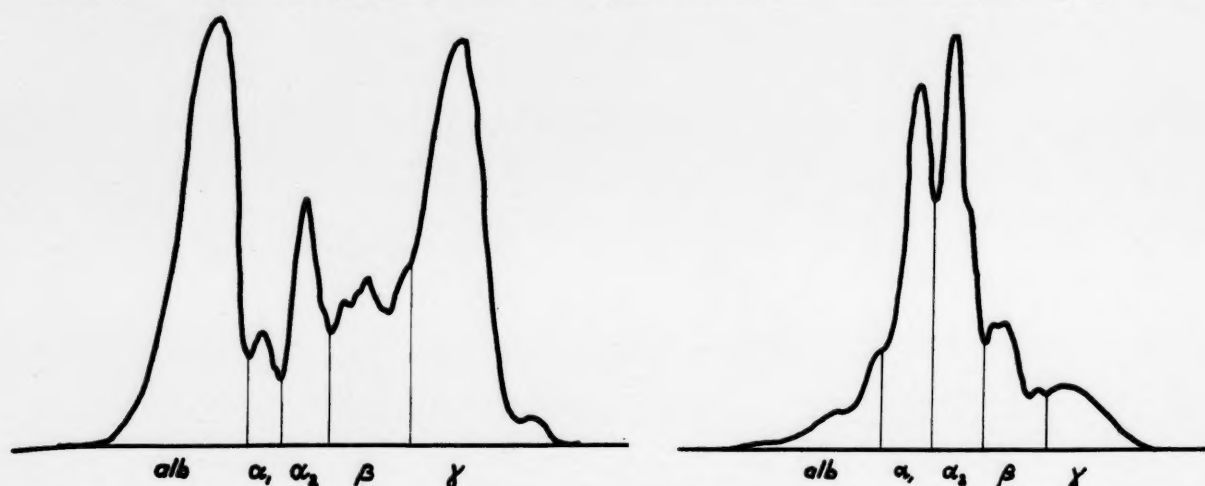


Fig. 3. Protein (left-hand curve) and carbohydrate (right-hand curve) patterns of a serum from a case of amyloidosis.

ride is in the α_1 - and in the first α_2 -globulins. It is noted in particular that in the first α_2 -globulin the polysaccharide increase is proportional to an increase in protein, while the change in α_1 means that this component has been qualitatively changed and enriched in carbohydrate. Perhaps this latter observation will be explained on the basis of the splitting of α_1 in two components.

If we compare the protein diagrams for normals with those of tuberculous cases and cases of tuberculosis complicated with amyloidosis, it will be obvious that the deviations are essentially the same but they are more marked in amyloidosis. Similarly it will be found that the polysaccharide changes are also essentially the same, and more marked in amyloidosis.

Finally the polysaccharide content of the different components was calculated as per cent of the protein on the basis of the protein and polysaccharide diagrams. It was found that there was an increase of the polysaccharide content in the α_1 -globulin, which was greatest in amyloidosis. In all other components, no significant changes in polysaccharide content in relation to protein were found.

SUMMARY

In cases of tuberculosis with and without amyloidosis alterations of the electrophoretic serum patterns are essentially the same, but they are more marked in amyloidosis. Improvements of the methods for electrophoretic separation on paper and PAS-staining of the protein-bound carbohydrates have been introduced and are described.

REFERENCES

- ¹ T. ARONSSON AND A. GRÖNWALL, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 9 (1957) 338.
- ² J. KOHN, *Clin. Chim. Acta*, 2 (1957) 297.
- ³ W. GRASSMAN, K. HANNIG AND M. KNEDEL, *Deut. med. Wochschr.*, 76 (1951) 333.
- ⁴ E. KÖIW AND A. GRÖNWALL, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 4 (1952) 244.

SPURENNACHWEIS VON ALBUMIN DURCH ANALYSE VON ANTIGEN-ANTIKÖRPERPRAEZIPITATEN

FRIEDRICH LOHSS UND EKKEHARD KALLEE

Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen (Deutschland)

LEVINE¹, DELAVILLE² und SCHWERT³ haben gezeigt, dass Trichloressigsäure (TCA)-gefälltes Albumin in 80% Aceton (Ac) bei Zimmertemperatur wieder löslich wird und dass dabei keine Änderung seiner physiko-chemischen Eigenschaften eintritt. Bei einer Überprüfung dieser uns robust erscheinenden Prozedur⁴ konnten wir die von den genannten Autoren erhobenen Befunde bestätigen und darüberhinaus mit DEBRO und Mitarb.⁵ feststellen, dass die Methode allgemein zur Präparation hochgereinigter Albuminfraktionen beim Menschen und bei verschiedenen Säugetieren geeignet ist, da Globuline bei der TCA-Ac-Extraktion unlöslich bleiben. Schliesslich konnten wir auch Albumin aus Antigen(AG)-Antikörper(AK)-Prazipitaten extrahieren, in quantitativen Versuchen bis zu 83%. Auch das hierbei verwendete ¹³¹I-Albumin hatte weder seine elektrophoretischen noch seine immunbiologischen Eigenschaften verloren. So steht durch die Wiederauflösung von AG-AK-Prazipitaten ein einfaches, spezifisches Verfahren zur Darstellung von Albumin zur Verfügung, das bei der Präparation kleiner Albuminmengen aus biologischem Material von Bedeutung sein kann.

Will man mit der von uns beschriebenen Technik kleinste Albuminmengen papierelektrophoretisch nachweisen, so kann allerdings auf eine Markierung des AG mit Radioisotopen nicht verzichtet werden, da nach Versuchen von BENNHOLD und KALLEE^{6, 7} infolge Eiweissadsorption an Whatman- oder ähnliche Papiere sich Proteine unter einer Grössenordnung von 50–100 μ g nicht mehr einwandfrei auftrennen lassen. Die elektrophoretische Untersuchung kleinster radioaktiver Proteinmengen wird aber möglich durch eine Inaktivierung der Adsorption des Papierstreifens; in den folgenden Versuchen wurden von uns wie in Fig. 1 dazu nichtradioaktive, unverdünnte Seren verwendet und von den Mischelektrophoresen (zusammen mit dem radioaktiven Spurenprotein) Autoradiogramme angefertigt. So können kleinste Proteinmengen von wenigen μ g sichtbar gemacht⁷ und ihre Wanderungsgeschwindigkeiten mit denselben, meist mit Amidoschwarz 10 B angefärbten Streifen verglichen werden.

Im Folgenden wird über die Anwendung der geschilderten Technik bei dem Serum eines als Analbuminämie von BENNHOLD und Mitarb.⁸ beschriebenen Falles von Defektdysproteinämie berichtet. Da die ebenfalls analbuminämische Schwester F. des Probanden K. schon wiederholte Albumininfusionen bekommen hatte, war ihr Serum für die vorliegenden Untersuchungen nur noch bedingt verwendbar.

Zu den Immunprazipitationen wurde ein bei Kaninchen mit elektrophoretisch einheitlichem Humanalbumin erzeugtes Antiserum verwendet. Das gewonnene AG-

AK-System erschien nach dem Verlauf der Heidelberger-Kurve, der Analyse an den Überständen auf AG und AK, sowie nach immunelektrophoretischen Untersuchungen^{9, 10} einheitlich, auch in quantitativen Albuminbestimmungen an Normalseren war eine gute Übereinstimmung mit Werten der Elektrophorese erzielt worden.

Bei der quantitativen Praezipitinreaktion mit diesem Albumin-Antiserum und den Seren des Geschwisterpaares hatten sich nach Zusätzen bis zu etwa 1000 μg

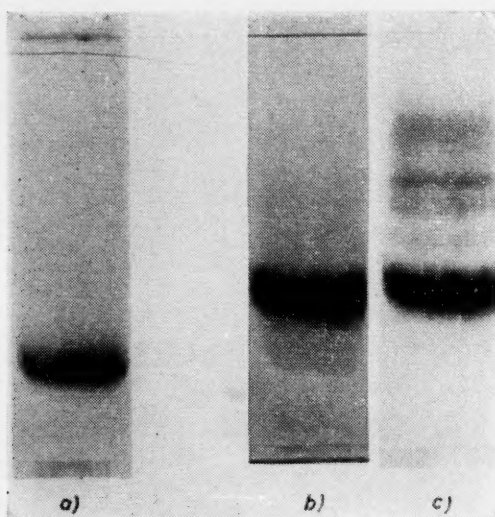


Fig. 1. a) Papierelektrophorese von Humanalbumin, aus AG-AK-Praezipitat zurückgewonnen, mit Amidoschwarz 10 B gefärbt; b) und c) Mischelektrophoresen von nichtmarkiertem Humanserum mit ^{131}I -Humanalbumin, letzteres aus AG-AK-Praezipitat zurückgewonnen; b) Autoradiogramm, c) Amidoschwarz 10 B-Färbung. Die Bande des Autoradiogramms deckt sich mit der Albuminbande des Amidoschwarzstreifens.

Protein-N keine sichtbaren Praezipitate gebildet; nach noch grösseren Zusätzen waren kleine Niederschläge aufgetreten, mit deren spezifischer Wertung wir aber bei so hohen Proteinkonzentrationen zurückhaltend waren.

Nachdem OTT¹¹ durch Zonenelektrophorese (Pappeblock)¹² aus dem Analbuminämieserum K. zwei von den Globulinen deutlich abgesetzte Vorfraktionen V und V' angereichert hatte, bildeten diese zusammen mit Humanalbumin-Antiserum ein deutlicheres Praezipitat. Dieses hätte umgerechnet auf die Ausgangsmenge von 5 ml



Fig. 2. Immunelektrophorese mit Humanserum-Antiserum gegenüber folgenden Antigenen: K = Analbuminämieserum K. F = Analbuminämieserum F. Es enthält noch einen Rest Albumin (nach Infusion). N = Normalserum mit gut ausgebildeter Albuminbande.

Serum einer Konzentration von 1.6 mg% Humanalbumin entsprechen können. Auch nach immunbiologischen Bestimmungen von SCHULTZE können sich in dem Serum K. kleine Mengen von Humanalbumin befinden. Neuerdings durchgeführte Immunelektrophoresen^{9, 10, 13} mit den Seren des Geschwisterpaares zeigten, dass mit dieser Technik

darstellbare Proteinkomponenten rascher elektrophoretischer Beweglichkeit nicht mit Albumin, sondern mit einer α -Globulinfraktion identisch sind. SCHULTZE kam mit einem anderen Antiserum zu demselben Ergebnis; es handelt sich bei der weit anodenwärts wandernden Fraktion beider Analbuminämieseren um mit Fettfarbstoffen anfärbbares α -Lipoproteid. Wir konnten auch bei einer mit doppelter Serummenge K. durchgeführten Immunelektrophorese keine Praecipitationslinie entdecken, die für eine Albuminspur hätte sprechen können. Dagegen konnte in dem Analbuminämieserum der Schwester F. noch ein Rest Albumin nach einer früheren Infusion nachgewiesen werden. Um möglicherweise aber doch Spuren von Albumin aus dem Serum K. zu identifizieren, wandten wir das TCA-Ac-Verfahren nach Immunpraecipitation mit dem Albumin-Antiserum an.

In einem Vorversuch b setzten wir 0.2 mg ^{131}I -Albumin (Abbott), eine Menge, die wir im Hauptversuch a erwarten konnten, 2 ml Analbuminämieserum K. zu. Bei der Autoradiographie der Papierelektrophorese dieses Gemisches zeigte es sich, dass Humanalbumin in dieser Grössenordnung noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden kann, da trotz Gegenwart des Serums K. eine anscheinend für Albumin spezifische Adsorption an das Papier erfolgt, die durch die vorhandenen Globuline nicht verhindert werden kann.

TABELLE I

RADIOAKTIVITÄT IN % VON ^{131}I -ANTIGEN BEI DER EXTRAKTION AUS DEM PRAEZIPITAT MIT HUMANALBUMIN-ANTIKÖRPER

Extr. Nr.	a) Praecipitat mit ^{131}I -Analbuminämieserum		b) Praecipitat mit Analbuminämieserum bei Zusatz von 0.2 mg ^{131}I -Albumin	
	% Ausgangsradioaktivität des AG-AK-Praecipitats	^{131}I -AG % extrahiert	% Ausgangsradioaktivität des AG-AK-Praecipitats	^{131}I -AG % extrahiert
0	100	0	100	0
1. TCA-Ac	93.2	6.8	58.5	41.5
2. TCA-Ac	90.0	3.2	38.5	20.0
3. TCA-Ac	87.0	3.0	29.4	9.1
4. H_2O	87.0	ca. 0	25.8	3.6
Extrahierte Antigenmenge %		13.0	74.2	

Im Hauptversuch a markierten wir 10 ml Analbuminämieserum mit $^{131}\text{I}_2\text{-CCl}_4^{14}$.

Durch Humanalbumin-Antiserum zu den Versuchen a und b (starker Antikörperüberschuss) bildeten sich erwartungsgemäss Praecipitate, die nach 24 Stunden zentrifugiert und 3 mal mit 0.9% NaCl gewaschen wurden. Anschliessend erfolgte eine Behandlung mit TCA und Ac wie oben beschrieben. Bei mehrmaliger Antigenextraktion ergaben sich die in der Tabelle I zusammengefassten Befunde.

Aus dem Praecipitat des radioaktiven Analbuminämieserums konnten nur 13% des Antigenmaterials wieder in Lösung gebracht werden, was sehr für eine Mitpraecipitation von Globulinen sprach, die bei der TCA-Ac-Behandlung ungelöst bleiben. Dagegen war es gelungen, entsprechend früheren Versuchen⁴ mehr als 70% des zu dem Serum K. zugesetzten ^{131}I -Albumins nach der Immunpraecipitation durch TCA-Ac-Behandlung wiederzugewinnen. Dieses konnte nach Dialyse und Einengen in Dex-

tranbrei durch Mischelektrophorese mit normalem Humanserum und anschliessende Autoradiographie wieder einwandfrei nachgewiesen werden.

In Analogie zu Fig. 3 wurden nach Dialyse und Einengen auch Mischelektrophoresen mit dem wiedergelösten Antigenmaterial durchgeführt, dass zu nur 13% aus dem mit Antialbumin serum entstandenen Praezipitat von 10 ml ^{131}I -Analalbuminämieserum extrahiert worden war. Hierbei ergab das Autoradiogramm 2 Banden, deren grössere eine Beweglichkeit zwischen dem Albumin und α_1 -Globulin besitzt, die andere Bande zeigt ein Verteilungsmaximum, das wenig anodenwärts vom Albumin lokalisiert werden muss. Nach der photometrischen Auswertung der Amidoschwarzfärbung und des Autoradiogramms beträgt die Differenz der beiden auf dem Film dargestellten Banden vom α_1 -Globulin und Albumin des Amidoschwarzstreifens jeweils 0.2 cm.

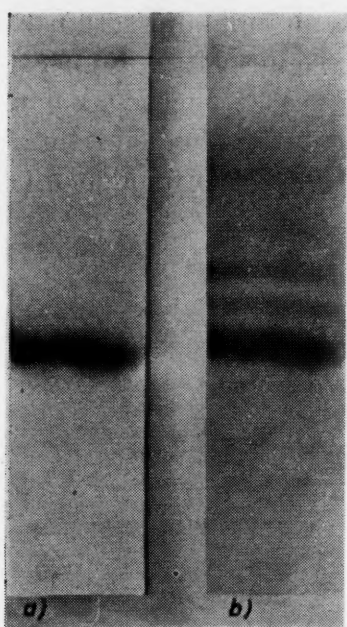


Fig. 3. Darstellung von Albuminspuren durch Mischelektrophorese mit normalem Humanserum. a) ca. 20 μg ^{131}I -Albumin aus AG-AK-Präcipitat, Autoradiogramm; b) Amidoschwarz 10 B-Färbung der Mischelektrophorese.

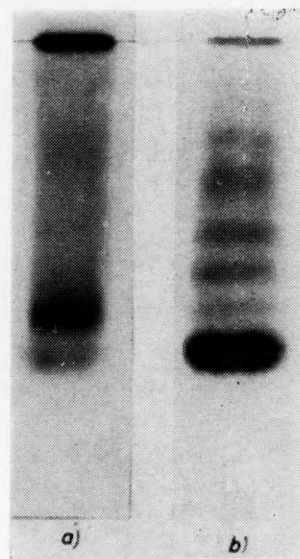


Fig. 4. Mischelektrophoresen von Antigenmaterial aus dem AG-AK-Praecipitat von Humanalbumin-Antiserum und 10 ml ^{131}I -Analalbuminämieserum. a) Autoradiogramm; b) Amidoschwarz 10 B-Färbung.

DISKUSSION

Es ist bekannt, dass kleine Albuminmengen durch die Papierelektrophorese infolge der Adsorption nicht nachgewiesen werden können. Auch in Gegenwart des Analalbuminämieserums gelingt ein Nachweis kleinster Mengen nicht, da auch grössere Globulin-Mengen bei der vorliegenden Versuchsanordnung die offensichtlich spezifische Albuminadsorption nicht verhindern können. Über den Weg der Immun praecipitation, TCA-Ac-Extraktion, Mischelektrophorese mit Normalserum und Autoradiographie kann man dagegen einen Nachweis von Albuminspuren erbringen.

Ausserdem hatte sich bei unseren Versuchen herausgestellt, dass mit der beschriebenen Technik die Überprüfung eines Albumin-Antialbuminsystems mit einer Empfindlichkeit möglich ist, welche die bisher bekannten Methoden übertrifft. Kleine Unspezifitäten, die bei der Bestimmung des Albumin-Gehaltes z.B. aus Normalserum

ohne wesentliche Bedeutung sind, können aber bei den Analbuminämiefällen stark ins Gewicht fallen.

Wenn wir frühere Versuche überprüfen, so lässt sich retrospektiv feststellen, dass trotz Immunpraezipitation und TCA-Ac-Extraktion ein dargestelltes Albumin nicht frei von einer Präalbuminfraktion war (Fig. 1b). Nach Versuchen von SCHULTZE kommen in den untersuchten Analbuminämieseren immunologisch nachweisbare Mengen von tryptophanreichem Präalbumin vor. Wir müssen annehmen, dass unser Albuminantiserum wahrscheinlich kleinere Mengen Antikörper gegenüber Präalbumin enthalten hat, auch wenn diese durch die Immunelektrophorese mit einem Humanserum nicht dargestellt werden konnten. Die Schwierigkeiten, α -Globulin vom Albumin völlig zu trennen, sind bekannt. So können wir auch nicht sicher ausschliessen, dass unser Antiserum auch noch Spuren von α -Globulin-Antikörpern enthielt, die ebenfalls den bisherigen Überprüfungsmethoden entgingen.

Somit ist es denkbar, dass es sich bei den dargestellten Banden, die nach Fig. 4 jeweils um 0.2 cm schneller wandern als Albumin oder α_1 -Globulin, um kleine Mengen von Präalbumin und um eine α_1 -Globulinfraktion gehandelt hat. Auch halten wir es für möglich, dass im vorliegenden Extremfalle kleine Fraktionen zur Darstellung gebracht wurden, die nicht den Charakter des üblichen Albumins besitzen und auch noch nicht näher definierbar sind, da sie normalerweise im Serum durch die grossen Albuminmengen überdeckt werden.

Es soll allerdings noch darauf hingewiesen werden, dass nach Untersuchungen amerikanischer Autoren¹⁵ radiojodiertes Albumin eine raschere Beweglichkeit besitzen kann als nicht markiertes. Bei unserem Parallelversuch (b) hatte sich aber keine sicher messbare Differenz ergeben.

Die Frage, ob es sich bei dem Geschwisterpaar um quantitative Analbuminämiefälle handelt, ist deshalb von besonderem Interesse, da beide Personen als Träger eines rezessiven Erbleidens aufgefasst werden müssen⁸, bei dem für die Bildung der Albumine ein eigenes Gen verantwortlich gemacht werden könnte. Wir brauchen demnach für weitere ähnliche Versuche ein Immunserum mit einwandfreier Albuminspezifität oder müssen Absättigungen am Albumin-Antiserum durchführen. Zur Erzielung eines Humanalbumin-Antiserums mit idealer Spezifität wäre eine Absättigung mit einem quantitativen Analbuminämieserum in hervorragendem Masse geeignet. Obwohl das völlige Fehlen des Albumins im vorliegenden Falle noch nicht endgültig sicher ist, erscheint aber für weitere immunbiologische Versuche auch das Analbuminämieserum K. zur vorherigen Absättigung des Antiserums brauchbar, da erwartet werden kann, dass es in geeigneter Menge unspezifische, nicht aber alle Albuminantikörper erschöpft.

Es lässt sich mit den vorgetragenen Versuchen nicht mit letzter Sicherheit ausschliessen, dass sich in dem Analbuminämieserum K. Spuren von Albumin befinden, doch ist es uns trotz Anwendung der beschriebenen empfindlichen Technik bisher nicht gelungen, einen eindeutigen Albuminnachweis zu erbringen.

DANK

Die Autoren sind Herrn Professor SCHULTZE (Behring-Werke, Marburg/Lahn) zu besonderem Dank verpflichtet. Er stellte das zur Immunisierung benützte Albumin zur Verfügung sowie die Ergebnisse immunelektrophoretischer Untersuchungen an

den Albuminämieseren, auch zur Identifizierung von tryptophanreichem Präalbumin. Die Immunelektrophoresen (Fig. 2) wurden in Gemeinschaft mit den Herren Dr. OTT und Dr. GERGELY durchgeführt.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über ein Verfahren berichtet, mit dem minimale Albuminmengen aus biologischem Material dargestellt und immunbiologische Ergebnisse überprüft werden können. Durch Trichloressigsäure (TCA) und Aceton (Ac) lassen sich bis zu 80% eines Albuminantigens aus seinem Antigen (AG)-Antikörper (AK)-Praecipitat wieder lösen. Globuline werden durch diese Prozedur denaturiert, wogegen Albumin weder seine AG-Eigenschaften noch seine spezifische elektrophoretische Beweglichkeit verliert und nach der AG-AK-Precipitation zu weiteren Untersuchungen zur Verfügung steht. 200 μ g zu Analbuminämieserum zugefügtes, radiojodiertes Humanalbumin wurden so isoliert und durch Autoradiographien von Papierelektrophoresestreifen direkt nachgewiesen; um mehr als eine Zehnerpotenz niedrigere Mengen sind noch erfassbar. Mit 10 ml eines radiojodierten Analbuminämieserums und einem scheinbar spezifischen Anti-Albumin-Kaninchenserum entstand eine geringe Menge AG-AK-Praecipitat. Dieser Niederschlag enthielt grösstenteils in TCA-Ac unlösliche Globuline, nur 13% des AG waren extrahierbar und erschienen im Autoradiogramm der Papierelektrophorese als 2 Komponenten, die eine wanderte wenig schneller als Albumin, die andere zwischen α_1 -Globulin und Albumin. Ein sicherer Nachweis von Albuminspuren bei der von BENNHOLD beschriebenen Defektdysproteinämie konnte somit nicht erbracht werden.

SUMMARY

DETECTION OF TRACE AMOUNTS OF ALBUMIN BY ANALYSIS OF ANTIGEN-ANTIBODY PRECIPITATES

Extremely small amounts of albumin can be prepared by extraction of radioiodinated albumin from antigen (= AG)-antibody (= AB) precipitates with trichloroacetic acid (= TCA) and acetone (= Ac). During this procedure globulins become denatured whereas albumin retains its specific electrophoretic mobility and immunological properties. 200 μ g of radioiodinated serum albumin (Abbott) were added to 2 ml of an analbuminaemic serum and immunologically precipitated. 70% of the precipitated serum were extractable with TCA-Ac and then directly detectable in autoradiograms of paper electrophoresis strips. The limits of this method lay in the range of less than one tenth of this figure. After the extraction with TCA-Ac of an AG-AB precipitate obtained from 10 ml radioiodinated analbuminaemic serum, no albumin could be detected. Whereas the anti-human-albumin serum used seemed to possess a high specificity, only 13% of the AG could be removed from the AG-AB precipitate, and the extract consisted of 2 components in autoradiograms of paper electrophoresis strips. One of these components migrated slightly faster than albumin, the other more slowly between albumin and α_1 globulin. Thus we were unable to detect, even with this most sensitive technique, proteins unequivocally representing albumin in one of BENNHOLD's cases of analbuminaemia.

LITERATUR

- ¹ S. LEVINE, *Arch. Biochem.*, 50 (1954) 515.
- ² M. DELAVILLE, G. DELAVILLE UND I. DELAVILLE, *Ann. pharm. franç.*, 12 (1954) 109.
- ³ G. W. SCHWERT, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 139.
- ⁴ E. KALLEE, F. LOHSS UND W. OPPERMAN, *Z. Naturforsch.*, 12b (1957) 777.
- ⁵ I. R. DEBRO, H. TARVER UND A. KORNER, *J. Lab. Clin. Med.*, 50 (1957) 728.
- ⁶ H. BENNHOLD, E. KALLEE UND E. ROTH, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 288.
- ⁷ E. KALLEE, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 508.
- ⁸ H. BENNHOLD, H. PETERS UND E. ROTH, *Verhandl. deut. Ges. inn. Med.*, 60 (1954) 630; H. BENNHOLD, *Verhandl. deut. Ges. inn. Med.*, 62 (1956) 657, 64 (1958), im Druck.
- ⁹ P. GRABAR UND C. A. WILLIAMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193.
- ¹⁰ J. J. SCHEIDEGGER, *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7 (1955) 103.
- ¹¹ H. OTT, *Z. ges. exptl. Med.*, 128 (1957) 340.
- ¹² G. KUNKEL UND J. AHRENS, *J. Clin. Invest.*, 28 (1949) 1575.
- ¹³ H. E. SCHULTZE, M. SCHÖNENBERGER UND G. SCHWICK, *Biochem. Z.*, 328 (1956) 267.
- ¹⁴ H. Z. BANKS, A. M. SELIGMAN UND J. FINE, *J. Clin. Invest.*, 28 (1949) 548.
- ¹⁵ I. R. GABRIELI, D. GOULIAN JR., TH. KINERSLY UND R. COLLET, *J. Clin. Invest.*, 33 (1954) 136.

UTILIZATION OF PROTEIN IN THE SMALL INTESTINE

FRITZ HARTMANN

Medical University Policlinic, Marburg/Lahn (Germany)

The role of the intestinal mucosa in the protein metabolism is not merely the passive one of letting the amino acids pass from the intestine into the blood of the portal vein by a simple diffusion procedure. This is disproved by the fact that the uptake and concentration of a yeast hydrolysate, marked with ^{35}S -methionine and administered enterally and parenterally, varied considerably in the different sections of the digestive tract¹. The upper sections of the intestine show the greatest activity in amino acid resorption. On the other hand, not all the food protein is broken down into amino acids by the proteases of stomach, pancreas and small intestine. Even a dog with no pancreas can utilise its food protein and does not pass it entirely undigested with the faeces². Homologous protein is quickly absorbed by the intestine without being broken down³. Under certain circumstances even heterologous proteins can be absorbed and give rise to allergic symptoms on repeated intake. It is probably the physiological function of the liver to pick out such allergenic proteins and render them harmless. The coma-like shock symptoms which sometimes occur in cases of liver cirrhosis after protein meals are presumably partly due to the fact that the allergenic proteins by-pass the liver by means of collaterals. This may well be the explanation of similar symptoms after the establishment of a portocaval shunt. In addition, the ammonia from the intestine plays an important part in causing such phenomena⁴. Like the heterologous proteins, partially broken down products of varying molecular size, as, for instance, the peptones, can retain their antigenic qualities⁵. The findings which support the resorption of proteins and peptides in the intestine are given in Table I⁶⁻²⁴. It is unlikely that the resorption of these corpuscles of high molecular size takes the form merely of passive penetration. This is disproved by the different mechanisms of resorption of homologous and heterologous proteins.

An active form of transport for the uptake of amino acids from the intestine can also be assumed. The experimental data which support this hypothesis are given in Table I²⁵.

EXPERIMENTAL

Our own experiments were concerned with the mode of resorption of amino acids from an amino-acid mixture in the upper part of the small intestine. In experiments on 16 dogs in pernocton anaesthesia a liver vein catheter from the right jugular vein and a polyvinyl tube were introduced into the stem of a mesenterial vein which transports the blood from the upper sections of the small intestine. A loop of the small intestine, measuring 30 cm, was tied at both ends and filled with a 2% amino-acid mixture in the form either of yeast-hydrolysate or "Aminovit". The loop of the intestine was replaced and the abdomen was closed provisionally. After 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, and 120 min, 10 ml of blood were taken from the efferent mesenterial

TABLE I

ARGUMENTS FOR THE ACTIVE TRANSPORT OF AMINO ACIDS, WHOLE HOMOLOGOUS-,
HETEROLOGOUS- AND PARTLY SPLIT HETEROLOGOUS PROTEINS

<i>A. Amino acids</i>	
1.	The resorption is independent of a) decrease of concentration b) constant of diffusion c) size of molecules ^{25, 26}
2.	Specific speed of absorption for each amino acid ²⁷
3.	Rhythmical modus of absorption ²⁸
4.	Competitive inhibitions of the amino acids ²⁹
5.	Permeation through intestinal wall greater than diffusion through membranes ^{28, 30}
6.	Permeation through intestinal wall constant in living loop, dependent on decrease of concentration in dead intestinal wall ³⁰
7.	Oxygen and adrenal cortex deficiency decrease absorption
8.	Varying concentration of the yeast hydrolysate marked with ³⁵ S methionine in different loops ¹
<i>B. Whole homologous and heterologous proteins^{6, 7}</i>	
1.	Genuine protein is absorbed ⁸
2.	Sensitization against foreign protein given enterally especially egg-, fish- and nut protein ⁹⁻¹¹
3.	Raw egg- and cows milk protein can be absorbed in the young mammal ^{12, 13}
4.	An antibody haemolytic anemia can be produced in the young rat ¹⁴
5.	Thyroglobulin can be absorbed in effective form ¹⁵
6.	Insulin can be absorbed in traces in effective form ¹⁶
7.	Homologous protein—for example serum albumine—is absorbed rapidly ^{3, 17}
8.	High pressure within the intestine or epithelial lesions promote protein permeation ^{18, 19}
9.	Mucosa of the small intestine and blood of the portal vein contain the same polypeptides after a protein meal ²⁰
<i>C. Peptides</i>	
1.	Peptone is absorbed twice as quickly as its components ⁵
2.	Quotient polypeptide N/polypeptide N + amino acid N is the same in intestinal content and in blood of portal vein ²¹
3.	Increase of high molecular protein breakdown products in blood after protein meal ²²⁻²⁴
4.	The dog without pancreas excretes only 2/3 of the food protein with the faeces ²

vein and from the liver vein respectively. The amino acids in the plasma samples were separated by one dimensional chromatography, using methyl/ethyl/ketone and phenol as solvents, and were estimated semiquantitatively by photoelectric methods with a margin of error of $\pm 0.15\%$. The results showed a considerable variation in the speed and concentration with which different amino acids appear in the blood of the mesenterial vein (Fig. 1). They appear much later in the blood of the liver vein, generally after some 15 min. The appearance of individual amino acids in the blood of the liver vein occurs separately and independently of the amino-acid concentration in the mesenterial blood. From this we conclude that the liver collects the amino acids coming from the area of the portal vein and stores them, breaks them down or uses them for protein synthesis according to its needs.

The changes in the amino-acid concentrations in the blood of the mesenterial vein during resorption do not correspond to those produced by the diffusion of the same amino-acid mixture through a cellophane tube in sterofundine. The behaviour of the individual amino acids varies considerably and shows no apparent relation to their concentration in the lumen of the intestine, to their molecular size or to their chemical properties. The resorption curve takes a rhythmic course and the individual

amino acids show different resorption maxima after 10, 30, 40 and 50 minutes. We take these findings as an indication that there is an active transport of the amino acids from the lumen of the intestine into the blood of the portal vein, or, in other words, that the intestinal mucosa plays an active part in amino-acid absorption.

Marked hypoproteinaemia is observed in chronic insufficiency of the pancreas, polyposis of the small intestine and sprue-like clinical conditions. This is generally attributed to insufficient breakdown of the food protein in the upper part of the small intestine. The second part of our experimental investigation was concerned with this

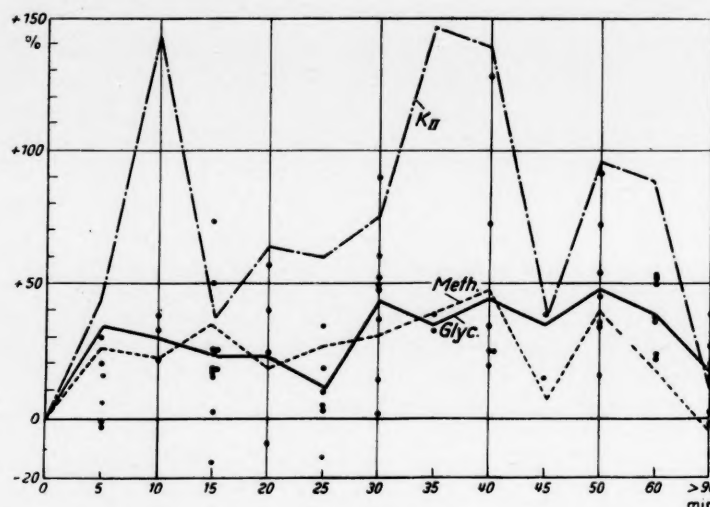


Fig. 1. Average changes of glycocholate- and methionine-concentration in mesenteric venous blood during absorption of amino acids from the intestine. Values for glycocholate are shown separately. K_{II} represents the changes for the amino acids: phenylalanine, isoleucine, leucine and norleucine.

question. Table II shows the important part played by the mucosa of the small intestine in protein metabolism. After the feeding of labelled amino acids, the greatest activity is observed in the intestinal mucosa. In experiments with ^{14}C -labelled glycine the figures of incorporation show the following ratio of intestine: marrow: liver:

TABLE II
ARGUMENTS FOR THE SYNTHESIS OF PROTEIN IN THE WALL OF THE SMALL INTESTINE

A. Cell protein (structure- and enzyme-protein)

1. Highest activity of the protein in the mucosa of the intestine after feeding of labelled amino acids (intestine : marrow : liver : plasma = 3.7 : 2.15 : 2.05 : 1.8; if ^{14}C -glycine is used; 7 : 2.3 : 5.3 : 4; if ^{14}C -tyrosine is taken³¹⁻³³)
2. Highest activity of the protein in the intestinal mucosa after giving ^{35}S -methionine or -cystine i.v. (twice as high as in the serum protein)^{34, 35}
3. Pieces of tissue of intestinal mucosa in an amino-acid solution incorporate more ^{35}S -methionine than tissue of liver or lymph nodes³⁶.

B. Serum protein

1. Assumption without experimental proof³⁷
2. After protein meal increase of polypeptides in the portal vein³⁸
3. The same polypeptides in the intestinal mucosa and in the blood of the portal vein²¹
4. Higher concentration of amino acids in intestinal mucosa than in the blood of the portal vein³
5. Globulines containing ^{35}S -methionine in the blood of the portal vein during the absorption of an amino-acid mixture out of the upper small intestine, containing ^{35}S methionine³⁶
6. Strong γ -globuline synthesis can be observed in the lower half of a rat without liver perfused by an amino-acid mixture containing lysine-2- ^{14}C ³⁹.
7. Abundance of lymphocytes in the mucosa of the small intestine, digestion lymphocytosis

kidney : plasma = 3.7 : 2.15 : 2.05 : 1.95 : 1.8. After the feeding of ^{14}C -labelled tyrosine the figures of incorporation show a ratio of 7 : 2.3 : 5.3 : 4. After the intravenous administration of ^{35}S -methionine, the protein of the intestinal mucosa shows the greatest protein activity of all organs tested; it was twice that of the protein in the plasma. From these results BANSI AND LUDWIG⁴⁰ and MÜTING⁴¹ have concluded in their monographies that the intestinal mucosa synthesizes protein. So far, however, the findings do not show, whether this protein is serum protein. It is only possible to state that structure protein is certainly synthesized, and principally enzyme protein, as the intestinal mucosa is so rich in enzymes. From the high figures of incorporation of labelled amino acids one may, however, assume, that the protein synthesis in the intestinal mucosa serves not only its own cellular needs but also the synthesis of protein leaving the cells by way of the portal vein. This is supported by the fact, that the activity subsides as rapidly as it commences. The mucosa of the small intestine seems to be extremely well fitted to synthesize protein, especially γ -globulines; for it contains in the submucosa, on a large surface in extensive contact with the contents of the intestine, a large depôt of lymphocytes and lymphoid plasma cells, whose importance for the synthesis of globulins can be demonstrated by the fluorescent antibody method. Under normal circumstances these

TABLE III
INCORPORATION OF ^{35}S -METHIONINE INTO BODY PROTEINS AFTER $2\frac{1}{2}$ h INCUBATION

Organs	Tissue derived from			Surrounding nutrient medium in 35 ml of		
	Liver	Small intestine	Lymph nodes	Liver	Small intestine	Lymph nodes
Impulses/min	2430	3150	1693	4890	2820	946
Ratio of incorporation	2	: 4	: 2	5	: 3	: 1
	Dialysed in sterofundine until no more activity is observed in the outer liquid.			Dialysis followed by protein precipitation in trichloroacetic acid.		

globulins can certainly not be synthesized in the liver. MILLER however has shown that they can be synthesized in the lower half of a rat from which the liver had been removed³⁹.

In the first test we incubated pieces of tissue from the mucosa of the small intestine, liver and lymph nodes, in an amino-acid solution containing glucose and supplied with a stream of oxygen for several hours at a temperature of 37°C . The amino-acid solution contained ^{35}S methionine, which had been obtained by chromatography from a hydrolysate from a culture of *Torula utilis* fed with radioactive sulphur. The pieces of tissue were then homogenized and dialysed in sterofundine until no more activity could be observed in the outer liquid. The results are given in Table III and show that the intestinal mucosa had taken up the largest amount of methionine. The nutrient solution was also dialysed until the surrounding liquid was free of activity, after which its protein was precipitated with trichloroacetic acid and the activity was estimated. During their incubation all three tissues had discarded protein into the surrounding liquid. This protein was also radioactively labelled. The experiment demonstrated the striking activity of the intestinal mucosa in protein synthesis, but

did not indicate whether the labelled proteins discarded into the outer liquid were of the serum-protein type.

Experiments were carried out on 6 dogs to illustrate the synthesis of plasma protein in the mucosa of the small intestine. The abdomen was opened and two neighbouring sections of the upper small intestine of equal length were tied off. The length of these sections corresponded to the area supplied by a medium branch of the mesenterial artery and thus with the draining area of a medium-sized branch of the

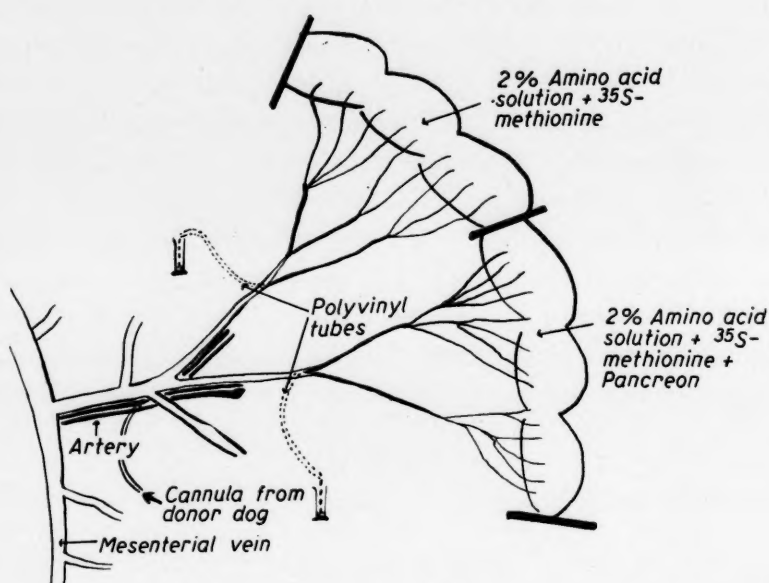


Fig. 2.

mesenterial vein (Fig. 2). A polyvinyl tube was tied into the efferent mesenterial veins, and the blood which dripped from it was collected in two cylinders over a period of 10 min each. To prevent interference by other organs which synthesize protein, particularly the liver, the loops of intestine were directly supplied through their arterial vessels with blood from the femoral artery of a donor dog. In a second series of experiments the loss of blood was compensated by an intravenous infusion of donor blood into the femoral vein of the experimental animal. Equal quantities of a 2% amino-acid mixture ("Aminovit") were injected into the two intestinal loops. The mixture was labelled with ³⁵S methionine purified by chromatography which had been obtained from a yeast culture of *Torula utilis*. Where the "Aminovit" mixture was used, sufficient methionine was added to give 1 ml of the amino-acid mixture 1 million impulses per minute. 10 tablets of pancreon were dissolved in one of the portions, or fresh pancreatic juice was squeezed into it. The loop was then replaced and the abdomen was provisionally closed. The experiments lasted for 1½–2 h. The plasma obtained in each 10-min period was analysed individually.

The plasma protein of each 10-min period was separated by paper electrophoresis. A separation on starch proved unpracticable as the free labelled methionine, particularly that absorbed onto the albumins and β -globulins, could not be separated. When separated on filter paper, the free ³⁵S methionine passes into the staining solution during the staining. The activity remaining on the paper corresponds to the methionine which is incorporated into the protein fractions. This procedure was carefully tested in control experiments. The sections of the filter paper containing the albumins and total globulins were analysed separately. The paper strips were

finely shredded and ashed as described by PIRIE. Conc. hydrochloric acid was added to the ashes and the acid allowed to evaporate. Then potassium sulphate was added as a carrier in order to obtain sufficient sulphate in the preparation for the precipitation with barium sulphate. The estimation of the activity was carried out with an end-window Geiger-Müller counter on 20 mg of barium sulphate per cm² precipitated on little plastic blocks. The activity was calculated as impulses/min/total amount of albumin or globulin in the 10-min experimental period.

RESULTS AND DISCUSSION

The results show that not only structure and enzyme protein but also serum protein is formed in the upper mucosa of the small intestine and passed into the portal vein. Only small amounts of albumin are synthesized. Principally globulins, α -, β -, and γ -globulins are formed. The speed of synthesis and delivery into the blood of the portal vein is great. Only 10 min after the injection of the amino-acid mixture into the intestine, newly synthesized globulins appear in the blood of the portal vein (Fig. 3). The peak of the synthesis lies between 30 and 40 min. Then, from 60–90 min, the amounts of labelled globulins decrease, as the absorption of amino acids from the small intestine lessens. The point of maximal synthesis of globulin in the intestinal mucosa coincides with the point of maximal amino-acid absorption. The experiment demonstrated that a further function of the mucosa of the small intestine in the utilization of amino acids consists in the synthesis of cell and serum protein. The importance of the liver for the synthesis of albumin and fibrinogen is not diminished by the fact that the small intestine synthesizes protein. It would however appear possible that the mucosa of the small intestine can synthesize albumin in small quantities and can, under certain circumstances, take the place of the liver or synthesize precursors of albumin. So far our experiments have been limited to the upper part of the small intestine; further experiments are necessary to show how far the function of plasma protein synthesis extends down the intestine.

The vital question is that of the enzymes taking part in the protein synthesis. Like all cells throughout the body, those of the small intestinal mucosa certainly contain kathepsins capable of breaking down and forming cell proteins. The special situation in the small intestine however is that the enzymes of the pancreatic juice are reabsorbed together with the various food components. Our problem was whether these proteases of the pancreatic juice play any part in the protein synthesis of the small intestinal mucosa. Theoretically the enzymes which break down protein can also synthesize protein from amino acids; this is an equilibrium reaction. In the intestinal lumen however, this reaction is shifted in favour of the breakdown process. It is possible however that conditions obtain in the intestinal mucosa under which the same proteases which break down food protein in the intestinal lumen form proteins from amino acids or small molecular peptides in the mucosa of the small intestine. Such conditions might possibly consist in alterations in the concentration of the hydrogen ions, or, more probably, in alterations of the substrate concentration. In this respect it is of importance that the mucosa of the small intestine concentrates the amino acids, so that the amino-acid content in the mucosa of the small intestine may be up to 11 times higher than in the blood of the portal vein. Another possibility is the excretion of protein-synthesizing enzymes with the pancreatic juice. LIPPMAN found such an enzyme in the pancreas which can synthesize a dipeptide out of

tryptophane. In our experiments with a freeze-dried pancreatic enzyme preparation we were unable to demonstrate any increase of the serum protein synthesis in the wall of the small intestine (Fig. 3). After the addition of fresh pancreatic juice however,

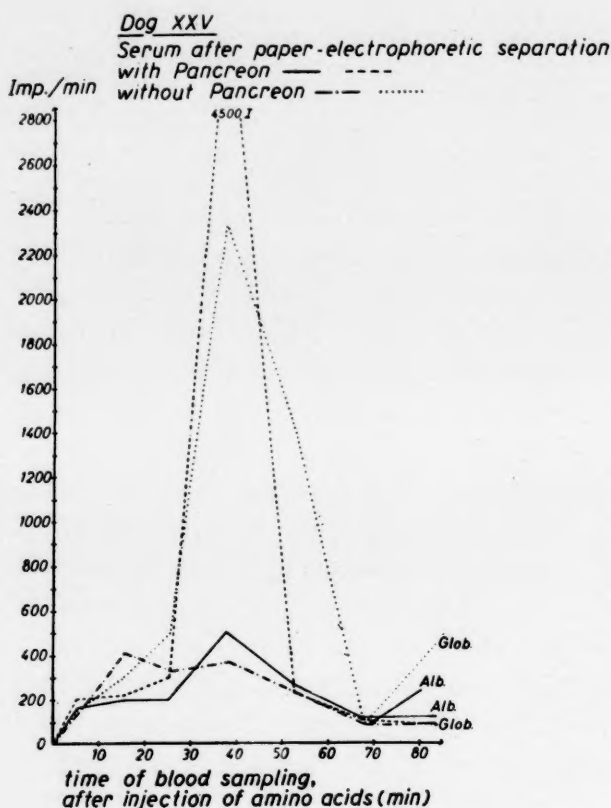


Fig. 3.

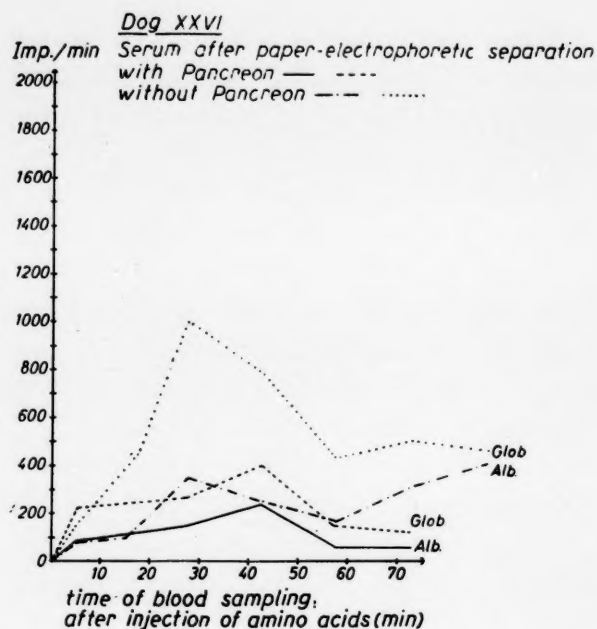


Fig. 4.

the globulin synthesis was distinctly higher (Fig. 4). It would therefore, seem probable that the synthesis of serum protein in the mucosa of the small intestine takes place by means of cell enzymes, but that fresh pancreatic juice contains enzymes capable of accelerating this protein synthesis.

SUMMARY

In comparing the function of liver, intestine and the mucosa of the small intestine, the latter was found to incorporate most actively ^{35}S -labelled methionine into protein *in vitro*. This function is believed to promote the synthesis of structure, enzyme, and serum proteins.

It was experimentally demonstrated with 26 dogs that on the uptake of an amino-acid mixture from the small intestine, protein is synthesized in the mucosa and is delivered into the portal vein. The quantity of protein synthesized was demonstrated with ^{35}S -labelled methionine derived from a yeast culture. The plasma proteins formed are mainly globulins; plasma albumin synthesis is very low. Enzymes of the pancreas are presumably involved in the protein synthesis through the mucous membrane of the small intestine. Experiments in which fresh pancreatic juice was added to the amino-acid content of a tied-off loop of the small intestine showed that it increased the rate of protein synthesis in the mucosa of the small intestine.

REFERENCES

- ¹ H. SCHLÜSSEL, *Klin. Wochschr.*, 31 (1953) 545; 34 (1956) 1288, 1290.
- ² F. HARTMANN AND K. KELLERHOFF, *Klin. Wochschr.*, 33 (1955) 896.
- ³ CH. DENT AND J. A. SCHILLING, *Biochem. J.*, 44 (1949) 318.
- ⁴ T. L. MURPHY, T. C. CHALMERS, R. D. ECKHARDT AND C. S. DAVIDSON, *New Engl. J. Med.*, 239 (1948) 605.
- ⁵ U. LOMBROSO, *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 13 (1938) 489.
- ⁶ D. W. NORTHUP AND E. J. VAN LIEVE, *Am. J. Physiol.*, 134 (1941) 288.
- ⁷ L. LASZT, *Arch. ges. Physiol. Pflüger's*, 240 (1938) 636.
- ⁸ C. VOIT AND J. BAUER, *Z. Biol.*, 5 (1869) 536.
- ⁹ M. WALTER, *J. Immunol.*, 11 (1926) 249.
- ¹⁰ W. BERGER AND K. HANSEN, *Allergie*, Thieme, Leipzig, 1940.
- ¹¹ A. WALTER AND M. WALTER, *J. Allergy*, 6 (1935) 532.
- ¹² R. S. COMLINE, H. E. ROBERTS AND D. A. TITCHEN, *Nature*, 167 (1951) 561; 168 (1951) 84.
- ¹³ A. F. ANDERSON, O. M. SCHLOSS AND C. MEYERS, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 23 (1925) 180.
- ¹⁴ W. TISCHENDORF AND R. FRANKE, *Z. ges. exptl. Med.*, 116 (1950) 92.
- ¹⁵ W. I. SALTER AND O. H. PEARSON, *J. Biol. Chem.*, 112 (1935) 579.
- ¹⁶ A. G. EATON AND J. R. MURLIN, *Am. J. Physiol.*, 104 (1933) 636.
- ¹⁷ U. PACHA, *Boll. soc. ital. biol. sperim.*, 13 (1938) 175.
- ¹⁸ J. P. HETTWER AND R. KRIZ-HETTWER, *Am. J. Physiol.*, 78 (1926) 136.
- ¹⁹ R. COUSKEY AND L. COOKE, *Pediatrics*, 16 (1955) 763.
- ²⁰ E. S. LOUDON AND N. P. KOTCHNEVA, *Arch. sci. biol. (U.S.S.R.)*, 37 (1935) 3.
- ²¹ E. S. LOUDON AND N. KOTCHNEFF, *Z. physiol. Chem.*, 228 (1934) 235.
- ²² G. EMDEN AND F. KNOOP, *Hoffmeisters Beiträge*, 3 (1903) 120.
- ²³ L. LANGSTEIN, *Hoffmeisters Beiträge*, 3 (1903) 373.
- ²⁴ E. FREUND, *Biochem. Z.*, 54 (1906) 88.
- ²⁵ A. POLSON, *Biochem. J.*, 31 (1937) 1903.
- ²⁶ F. SCHMEUGLER, *Arch. Ges. Physiol. Pflüger's*, 232 (1933) 591.
- ²⁷ R. H. WILSON AND C. H. B. LEWIS, *J. Biol. Chem.*, 84 (1929) 511.
- ²⁸ F. HARTMANN, H. LEUZ, C. LOPEZ-CALLEJA AND H. MÜNZENBERG, *Arch. exptl. Pathol. Pharmacol.*, *Naunyn-Schmiedeberg's*, 228 (1956) 403.
- ²⁹ R. HÖBER AND J. HÖBER, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 34 (1936) 486.
- ³⁰ R. HÖBER AND J. HÖBER, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 10 (1937) 401.
- ³¹ R. SCHOENHEIMER, S. RATNER AND D. RITTENBERG, *J. Biol. Chem.*, 127 (1939) 333.
- ³² D. M. GREENBERG AND TH. WINNICK, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 199.
- ³³ TH. WINNICK, F. FRIEDBERG AND D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 189.
- ³⁴ H. TARVER AND W. O. REINHARDT, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 395, 401.
- ³⁵ N. D. LEE, J. T. ANDERSON, R. MILLER AND R. H. WILLIAMS, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 733.
- ³⁶ F. HARTMANN, *Verhandl. deut. Ges. inn. Med.*, Wiesbaden, 1958.
- ³⁷ E. ABDERHALDEN, *Arch. ges. Physiol. Pflüger's*, 189 (1927) 311.
- ³⁸ N. P. KOTSCHNEFF, *Arch. ges. Physiol. Pflüger's*, 214 (1926) 343.
- ³⁹ L. L. MILLER, C. G. BLY AND W. F. BALE, *J. Exptl. Med.*, 99 (1954) 133.
- ⁴⁰ H. W. BANSI AND L. LUDWIG, *Ergeb. physik.-diät. Ther.*, IV (1951) 1.
- ⁴¹ D. MÜTING, *Der Aminosäuren-Haushalt des Menschen*, *Arzneimittel-Forsch.*, 8. Beiheft (1958).
- ⁴² L. G. ORTEGA AND R. C. MELLORS, *J. Exptl. Med.*, 106 (1957) 627.
- ⁴³ M. BERGMANN AND H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Biol. Chem.*, 119 (1937) 707.

DARSTELLUNG UND IDENTIFIZIERUNG ELEKTROPHORETISCH TRENNBARER ORGANPROTEINE AUF AGAR-GEL

M. KESSEL

I. Medizinische Klinik der Freien Universität, Berlin (Deutschland)

Die elektrophoretische Auftrennung von Organproteinen stiess stets auf erhebliche Schwierigkeiten, so dass bisher nur verhältnismässig wenige Mitteilungen auf diesem Gebiet erschienen sind. Bereits die Aufarbeitung der Organe zu löslichen und damit elektrophoretisch trennbaren Zell- bzw. Organproteinlösungen birgt methodisch mannigfaltige Fehlerquellen, wie auch von allen Autoren bisher betont wurde. Zudem besteht Zellprotein grösstenteils aus konjugiertem Protein und ist daher wesentlich heterogener als Serumprotein. Die Trennung war daher auf Filterpapier unbefriedigend. Der zur Verbesserung der Trennung einzuschlagende Weg wurde bereits 1954 gewiesen: "Wenn einmal Verfahren ausgearbeitet sind, welche die Adsorption von Protein an der Cellulose aufheben, dann wird die Elektrophorese eher geeignet sein, um Zellprotein aufzutrennen"¹.

Ein solches Verfahren glauben wir mit der Elektrophorese auf Agar-Gel nunmehr in der Hand zu haben. Agar-Gel als Medium zur elektrophoretischen Trennung von Proteinen^{2, 3} hat erst in letzter Zeit durch die Entwicklung der Immunelektrophorese⁴⁻⁶ zunehmende Bedeutung erlangt. Aber auch zur Untersuchung von Humanseren für klinische Zwecke ergaben sich Fortschritte^{7, 8}, besonders auf dem Gebiet der Lipoproteidforschung^{9, 10}. Es lag daher nahe mittels einer standardisierten Agar-Technik⁷ eine bessere elektrophoretische Trennung löslicher Organ-Eiweisse zu erzielen. Darüber hinaus erschien diese Methode geeignet um zur Frage der Identität der gleichsinnig wandernden Proteinfractionen im Organ-Homogenat und im Serum Stellung zu nehmen.

METHODIK

Zur Untersuchung wurden gesunde junge Kaninchen (ca. 3.5–5.0 kg) und gesunde weisse Laboratoriumsratten (ca. 240–270 g) nach wochenlangem gleichmässiger Fütterung herangezogen. Zur Vergleichsuntersuchung des Serums erfolgten Blutentnahmen aus den Ohrvenen der Kaninchen bzw. aus den Schwanzvenen der Ratten. Anschliessend wurden die Tiere durch Nackenschlag bzw. Aether-Narkose und Entblutung getötet. Die zu verwendenden Organe wurden herauspräpariert und sofort mit eiskalter physiologischer NaCl-Lösung sorgfältig bis zur völligen Blutfreiheit durchspült. Danach wurde den zerkleinerten Organen ein Veronal-Natrium-puffer (pH 8.6) im Verhältnis 1:1 beigegeben, worauf Homogenisierung in einem Homogenisator bei 24,000 UpM 1–2 mal je $\frac{1}{2}$ min erfolgte. Schliesslich wurden die so erhaltenen Organ-Homogenate 1 Std. bei 25,000 g hochtourig zentrifugiert. Nach Entfernung einer oberflächlichen Fettschicht gelangte der klare Homogenat-Überstand (im Folgenden einfach Organ-Homogenat genannt) mit einem Gesamt-Eiweissgehalt von 3.5–4.0 g % (Leber) bzw. 2.5–3.0 g % (Niere) direkt zur elektrophoretischen Auftren-

nung. Dabei wurde nach den üblichen Agar-elektrophoretischen Arbeitsvorschriften⁴⁻⁷ in gleicher Weise wie bei der Bearbeitung von Seren verfahren. In einzelnen Versuchsanordnungen wurden lediglich längere Glasplatten (25 × 6 cm) verwendet, um eine längere Wanderungsdauer (6 Std. bei 130 V konstant) und damit eine bessere Darstellung der Einzelfraktionen zu ermöglichen. Bei den Identifizierungsversuchen wurden chemisch reine Fraktionen verwandt*: Humanalbumin "reinst", Human α_2 -Glykoproteid, β_1 -metallbindendes Globulin und Human- γ -Globulin, die der normalen quantitativen Zusammensetzung des Serums entsprachen, so dass jeweils gleiche Volumina aufgetragen werden konnten.

ERGEBNISSE

Die Fig. 1 möge zum Vergleich zu unseren folgenden Ergebnissen die *papierelektrophoretische Trennung* der Homogenate von Leber und Niere mit den dazugehörigen Seren zeigen.

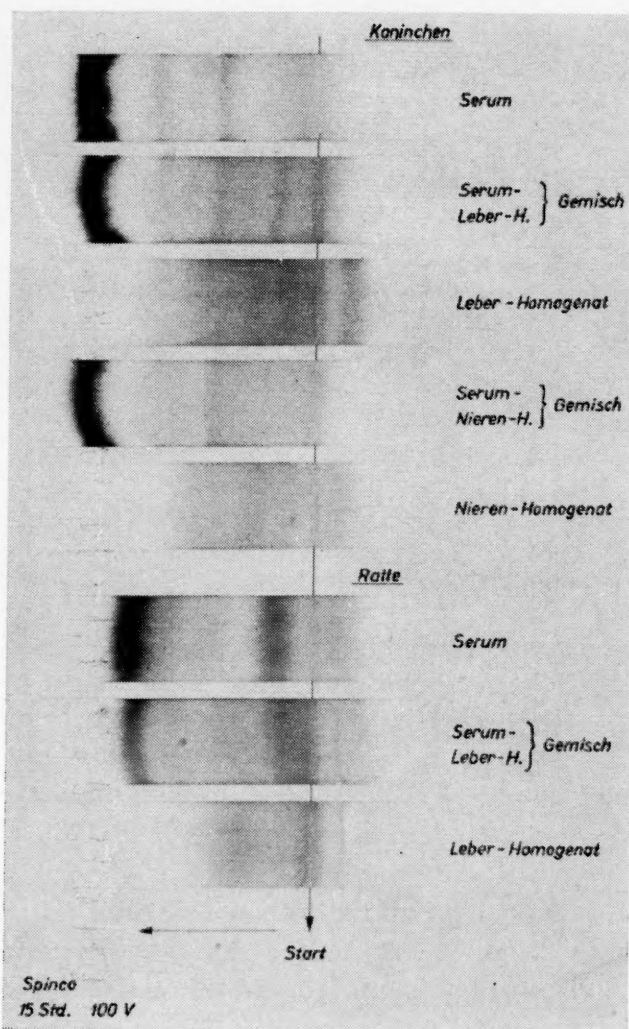


Fig. 1. Papierelektrophoretische Vergleichsuntersuchungen. Methode am hängenden Streifen in der Durrum'schen Kammer (Spinco) 15 Std. Laufzeit bei 100 V konstant. Bromphenolblau-Färbung.

* Für die Überlassung der reinen Protein-Fraktionen sind wir Herrn Prof. H. E. SCHULTZE, Behring-Werke, Marburg/Lahn sehr zu Dank verpflichtet.

Die Bilder der Organ-Streifen mit den dazugehörigen (hier nicht mit abgebildeten) Kurven entsprechen wohl denen der meisten Bearbeiter¹¹⁻¹⁵. Es zeigen sich im wesentlichen breite, stark verwaschene Banden aus denen sich nur einzelne stärker angefärbte Zonen erheben. Es fehlt eine genügende Absetzung der Einzelfractionen voneinander, wie es bei Serumproteinen bei guter Technik zu sehen ist. Zwar gelingt es mit Hilfe des Vergleichs eines reinen Organ-Homogenates mit einem Serum-Homogenat-Gemisch (Fig. 1) die bisherigen Feststellungen eines erheblichen Albuminmangels im Organ-Homogenat zu bestätigen, eine weitergehende Zuordnung der einzelnen Organ-Fractionen zu den bekannten Serum-Fractionen erscheint jedoch mit der papierelektrophoretischen Methode schwer möglich.

Dagegen zeigt die *Agar-elektrophoretische Methode* (Fig. 2) eine wesentlich bessere Trennung in einzelne Fractionen.

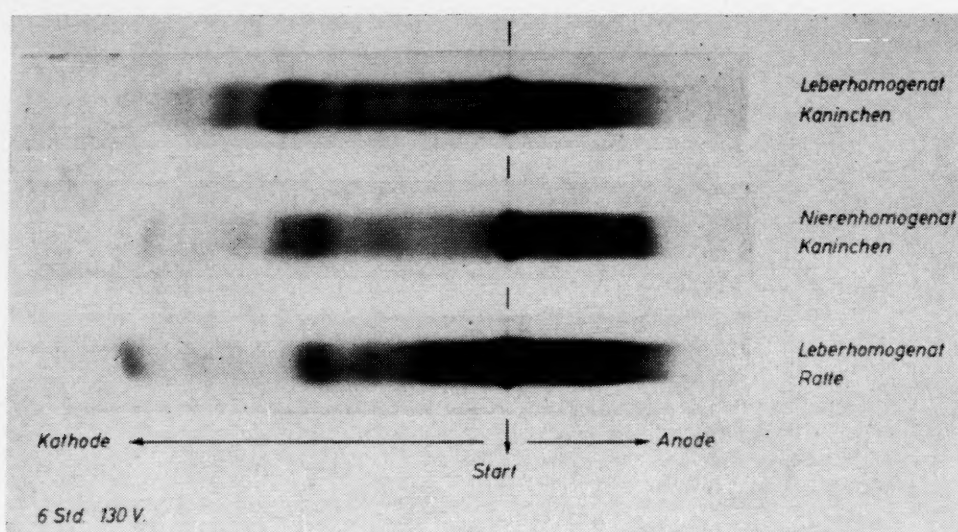


Fig. 2. Agarelektrophorese von Organ-Homogenaten.

Durch die besonderen Verhältnisse der Agarelektrophorese, insbesondere der hierbei auftretenden Elektroendosmose kommt es zu einer sowohl kathodischen als auch anodischen Wanderung. Zwar finden sich auf hier noch verwaschene Übergänge zwischen den Einzelfractionen, besonders im kathodischen Bereich kommt es jedoch zu einer recht guten Absetzung der Einzelfractionen voneinander. Es ergeben sich etwa 8-10 Fractionen, wobei die Bilder für Leberhomogenat von Kaninchen und Ratte einerseits, sowie von Leber- und Nierenhomogenat des Kaninchens andererseits gut zu unterscheiden sind. Man erhält für die gleichen Organe der gleichen Spezies immer wieder dieselben Trennungsbilder. Um die Fractionen nun näher identifizieren zu können, wurde die Auftrennung der Organ-Homogenate im Vergleich mit den dazugehörigen Tierseren, einem Human-Normalserum, sowie isolierten Reinfractionen in einem Versuchsgang unter exakt gleichen standardisierten Bedingungen vorgenommen (Fig. 3).

Bei der Betrachtung des auf Fig. 3 untenstehenden Streifens eines normalen Humanserums und den darüberstehenden isolierten humanen Reinfractionen fällt zunächst die bereits beschriebene⁷ schnellere Wanderung des reinen β_1 -Globulins auf, was vielleicht mit Änderungen des Milieus und der Oberflächenaktivität des aus dem Serumverband gelösten β -Globulin-Moleküls erklärt werden kann^{7, 16}. Zum an-

deren erkennt man bei Betrachtung des Human-Serum-Streifens und der Tierseren, dass die Wanderungsgeschwindigkeiten deutlich unterschieden sind. Diese Beobachtung wurde bereits mittels der freien¹⁷ und der Papierelektrophorese¹⁸ gemacht und konnte von uns für die Agar-Elektrophorese bestätigt werden¹⁹. Diese beiden Faktoren erschweren natürlich eine genaue Identifizierung bei der gewählten Versuchs-

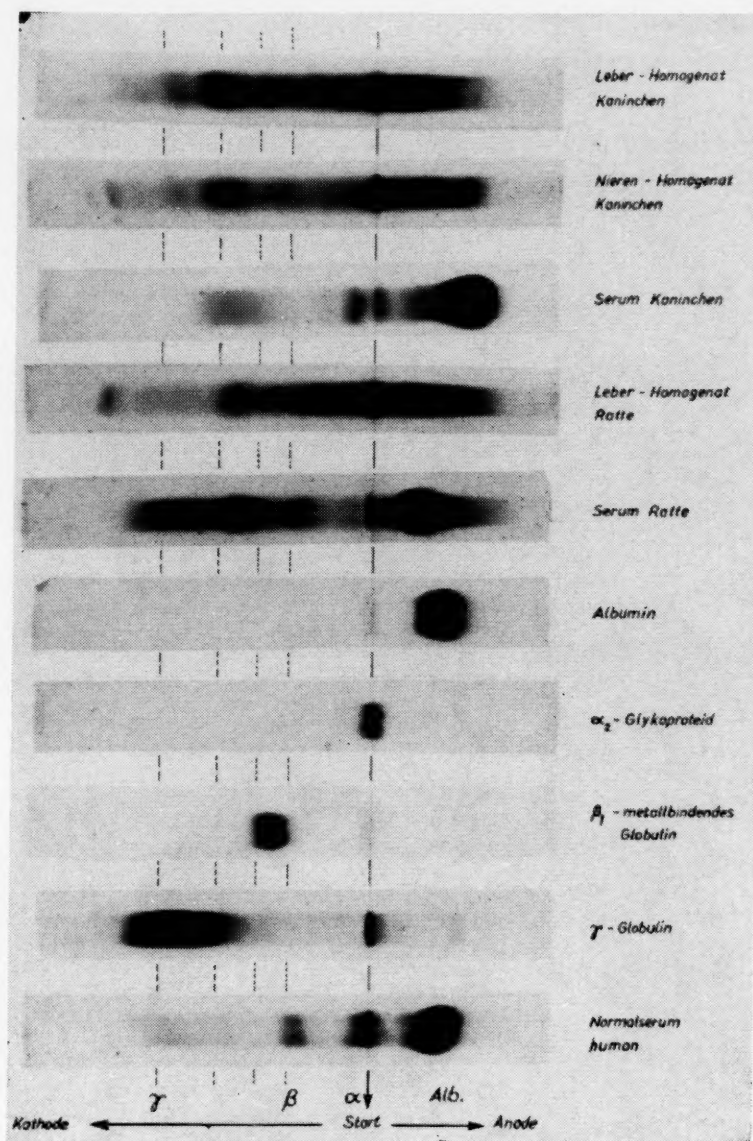


Fig. 3. Agarelektrophoretische Vergleichsuntersuchung von Organ-Homogenaten mit Tierseren, Human-Serum und isolierten Reinfractionen.

anordnung, so dass weitere Untersuchungen, insbesondere mit isolierten tierischen Reinfractionen u.dgl. erforderlich sind. Somit können hier nur erste Anhaltspunkte gegeben werden. Zunächst kann der bekannte Albuminmangel der Organ-Homogenate auch mit dieser Methode wiederum bestätigt werden. Die relativ stärkste Fraktion kommt den α-Globulinen zu. Nach einigen Zwischenfraktionen erkennt man die Bande einer recht gut abgesetzten, verhältnismässig stark angefärbten Fraktion, die als β-Globulin angesprochen werden dürfte, sowie anschliessend eine ebenfalls gut abgesetzte, aber etwas kleinere Fraktion, die dem γ-Globulin entsprechen

könnte, ferner weiter kathodisch gelegen einige gut getrennte geringer gefärbte Zonen, die den bisher bekannten Fraktionen, etwa des Serums, noch nicht zugeordnet werden können. Die Verhältnisse ändern sich je nach der Wanderungsdauer etwas, bleiben aber prinzipiell gleich.

Die Fig. 4 schliesslich zeigt die durch Transparenzphotometrie erhaltenen Kurven und deren flächenplanimetrische Auswertungsergebnisse (in Rel. %) mit Angabe der methodischen Fehlerbreite (S_D) nach Auswertung von jeweils 6 Organ-Homogenat-Trennungen.

Die Gauss'schen Kurven wurden in üblicher Weise eingezeichnet. Dort wo die Fraktionen nicht sicher zu trennen waren, wurden vorläufig zwei Fraktionen gemeinsam als eine ausgewertet. Die Ergebnisse beziehen sich auf gesunde Organe, wieweit

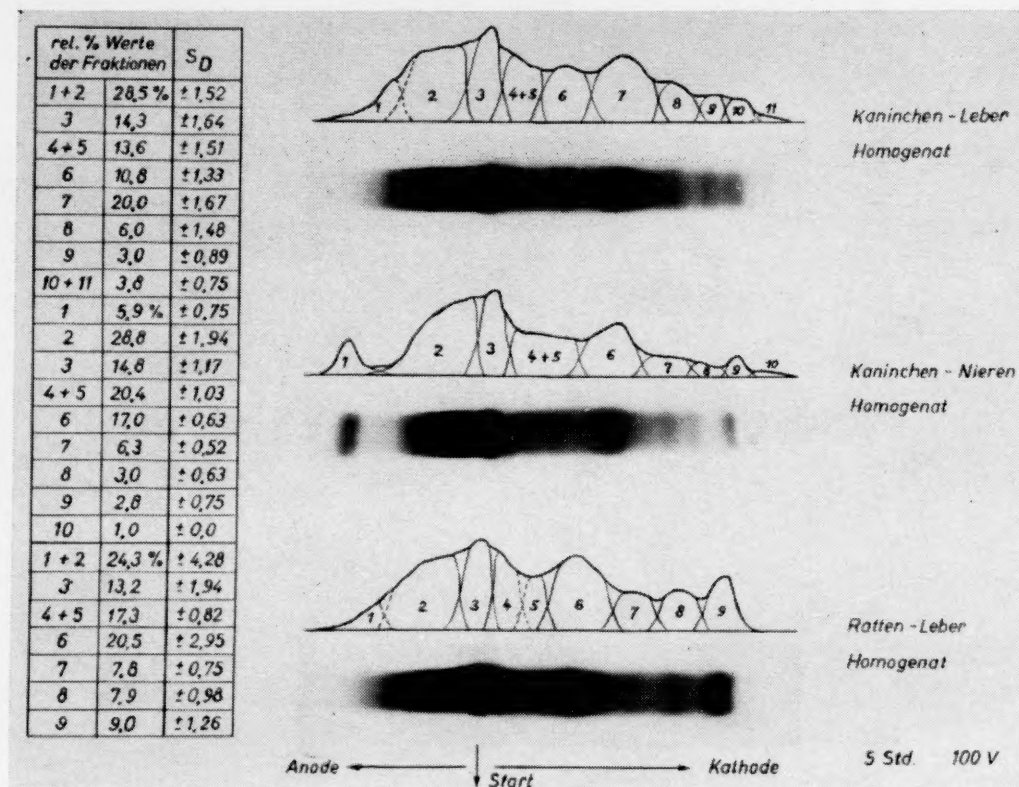


Fig. 4. Transparenzphotometrische Auswertungsergebnisse von Organ-Homogenaten.

pathologische Verhältnisse in ihren Abweichungen quantitativ erfasst werden können, kann bisher noch nicht gesagt werden. Jedenfalls erscheint die methodische Fehlerbreite (bis auf 2 Ausnahmen bei den Ratten-Leber-Homogenaten) im Bereich der üblichen Schwankungen zu liegen.

BESPRECHUNG

Die Aufarbeitung der Organe zu elektrophoretisch trennbaren Homogenaten entspricht im wesentlichen der auf diesem Gebiet allgemein geübten Technik^{11-15, 20-22}. Es dürfte sich also in erster Linie um schwach salzlösliche Cytoplasmaeiweisse handeln. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, müssen die einzelnen Arbeitsgänge selbstverständlich streng standardisiert ausgeführt werden. Bekanntlich ergibt bereits ein Wechsel in der Art des verwendeten Homogenisators u.U. Veränderungen in den Ergebnissen²². Es werden deshalb stets nur Untersuchungen mit jeweils der-

selben Technik sowohl bezüglich der Aufarbeitung als auch der elektrophoretischen Trennung direkt vergleichbar sein. Dennoch ergeben sich in einigen wesentlichen Punkten gute Übereinstimmungen auch bei Anwendung verschiedener Methoden. Der Hauptteil der Fraktionen ist zweifellos den Globulinen zuzuordnen, wobei die stärkste Fraktionen sicherlich den α -Globulinen entspricht. Dies stimmt teilweise mit den Ergebnissen der Papierelektrophorese, insbesondere aber mit denen der freien Elektrophorese überein. Bezüglich der Ratten-Leber-Homogenate entsprechen sowohl unsere Kurvenbilder als auch unsere Relativprozentwerte den mittels der freien Elektrophorese erhaltenen Ergebnissen^{20, 22}. Man fand auch dort einen hohen α -Globulin-Gehalt mit einer Schwankungsbreite (S_D) von $\pm 4.2\%$ ²². Weitergehende Differenzierungen, besonders der β - und γ -Globuline wurden nicht angegeben. Auch wir stießen hier auf Schwierigkeiten, die bereits angedeutet wurden. Durch weitere Untersuchungen mit isolierten, tierischen Reinfractionen, die uns bisher noch nicht zur Verfügung standen, sowie mit radioaktiv markierten isolierten Fraktionen dürfte es möglich sein, weitere Aufklärung zu erhalten. Die Menge der bei unserer Methodik am Startpunkt liegen bleibenden denaturierten Proteine könnte durch eine Änderung in der agarlektrophoretischen Technik vermindert werden²³. Unsere Methode dürfte eine Verbesserung der Erfassung quantitativer pathologischer Abweichungen ermöglichen, darüberhinaus eröffnen sich Ausblicke für eine Organ-Immunelektrophorese und für präparative Organ-elektrophoretische Trennungen, so dass unsere Kenntnisse über die Wechselwirkungen der Proteine zwischen den Körperflüssigkeiten einerseits und den Geweben andererseits bereichert werden könnten.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode zur elektrophoretischen Auftrennung der Organ-Proteine von Leber und Niere bei Kaninchen und Ratten auf Agar-Gel angegeben. Infolge der besonderen Wanderungsverhältnisse in diesem Milieu gelingt eine wesentlich bessere Trennung in Einzelfractionen als bei anderen Medien. Es werden etwa acht, besonders im kathodischen Bereich gut voneinander abgesetzte Fraktionen erhalten. Mit Hilfe von isolierten Reinfractionen des Serums wurde versucht, eine Identifizierung der einzelnen Organproteinfraktionen vorzunehmen. Das Verfahren eröffnet Möglichkeiten für Organ-Immunelektrophoresen und präparative Trennungen.

SUMMARY

ELECTROPHORETIC SEPARATION AND IDENTIFICATION OF TISSUE PROTEINS ON AGAR GEL

A method is described for the electrophoretic separation of tissue proteins derived from rabbit and rat liver and kidney, on agar gel. Owing to the specific migration in this medium, much better fractionation is obtained than in other media. About eight fractions are obtained which are well defined, particularly in the cathodic region. By comparison with isolated pure serum fractions of known mobility, these fractions could be identified. The method is suitable for immuno-electrophoretic analyses of the various organs and for their preparative separation.

LITERATUR

- ¹ CH. WUNDERLY, *Die Papierelektrophorese*, H. R. Sauerländer & Co., Aarau u. Frankfurt/M., 1954.
- ² C. W. FIELD UND O. TEAGUE, *J. Exptl. Med.*, 8 (1907) 86; 9 (1907) 222.
- ³ A. H. GORDON, B. KEIL, K. ŠEBESTA, O. KNESSL UND F. ŠORM, *Collection Českoslov. Chem. Communs.*, 15 (1950) 1.
- ⁴ P. GRABAR, *Proc. III. Intern. Congr. Biochem., Bruxelles*, 1955, Academic Press Inc., New York, 1956.
- ⁵ J. URIEL UND P. GRABAR, *Ann. inst. Pasteur*, 90 (1956) 427.
- ⁶ C. A. WILLIAMS JR. UND P. GRABAR, *J. Immunol.*, 74 (1955) 158, 397, 404.
- ⁷ F. A. PEZOLD UND H. THOMAS, *Z. exptl. Med.*, 129 (1957) 412.
- ⁸ R. J. WIEME, *Rev. belge pathol. et méd.*, 25 (1957) 62; *Klin. Wochschr.*, 34 (1956) 1264.
- ⁹ F. A. PEZOLD, *Klin. Wochschr.*, 35 (1957) 475.
- ¹⁰ F. A. PEZOLD, *Clin. Chim. Acta*, 3 (1958) 40.
- ¹¹ L. DEMLING, *Klin. Wochschr.*, 30 (1952) 74.
- ¹² L. DEMLING, H. KINZLMEIER UND N. HENNING, *Z. exptl. Med.*, 122 (1953) 416.
- ¹³ H. KÜCHMEISTER UND K. D. VOIGT, *Deut. Arch. klin. Med.*, 201 (1954) 1.
- ¹⁴ G. DI SABATO, *Experientia*, 12 (1956) 385.
- ¹⁵ A. SUNDERMANN UND H. J. ALTENBRUNN, *Z. ges. inn. Med.*, 11 (1956) 105.
- ¹⁶ R. S. GORDON, *J. Clin. Invest.*, 34 (1955) 477.
- ¹⁷ S. ROBERTS UND A. WHITE, *J. Biol. Chem.*, 178 (1949) 151.
- ¹⁸ G. BERG UND F. SCHEIFFARTH, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 472.
- ¹⁹ M. KESSEL UND R. RAUCH, in Vorbereitung.
- ²⁰ E. C. GJESSING, C. S. FLOYD UND A. CHANUTIN, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 155.
- ²¹ S. SOROF UND PH. COHEN, *Cancer Research*, 11 (1951) 376, 383.
- ²² S. SOROF UND PH. COHEN, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 303, 311.
- ²³ CH. WUNDERLY UND V. BUSTAMANTE, *Klin. Wochschr.*, 35 (1957) 758.

End of
papers presented at the Sixth Colloquium
on "Protides of the Biological Fluids",
Bruges, May 1958.

CONTENTS

Proteins, friend and foe of better mankind by CH. WUNDERLY (Zurich, Switzerland)	1
Über die moderne Untersuchungstechnik biologischer Flüssigkeiten und Präparate mittels der klassischen Elektrophorese und der Ultrazentrifuge von E. WIEDEMANN (Basel, Schweiz)	6
Quantitative immunologische Bestimmung von Plasmaproteinen von H. E. SCHULTZE und G. SCHWICK (Marburg, Deutschland)	15
Immunochemische Untersuchungen mit Prothrombin und Thrombin von G. SCHWICK und H. E. SCHULTZE (Marburg, Deutschland)	26
Über natürliche Hemmstoffe des Intrinsic Factor von H. C. HEINRICH und J. KÜHNAU (Hamburg, Deutschland)	36
Comparative studies of the protein fractions from human gastrointestinal juices with paper electrophoresis combined with various detection methods by J. C. M. VERSCHURE (Utrecht, The Netherlands)	38
Application diagnostique de l'enzymo-électrophorèse des déshydrogénases de l'acide lactique par R. J. WIEME (Gand, Belgique)	46
Erfahrungen mit der quantitativen Aminosäurebestimmung an Ionenaustauschersäulen und automatischer Registrierung der Ergebnisse von K. HANNIG (München, Deutschland)	51
Coloured substances as an experimental tool in the study of electrophoretic techniques by H. PREYERS and P. VUYLSTEKE (Bruges, Belgium)	58
Charakterisierung von Speichelproteinen von F. GABL und E. EGGER (Innsbruck, Österreich)	62
Sur l'existence d'une relation entre le taux des γ -globulines sériques et le nombre des plasmocytes médullaires chez les noirs africains par E. VAN OYE, G. VAN ROS et P. CHARLES (Léopoldville, Congo, Belge)	68
Études sur les protéines du liquide céphalo-rachidien par P. BURTIN (Paris)	72
Purification and properties of different haptoglobins by C. B. LAURELL (Malmö, Sweden)	79
Haptoglobin und Erythrokinetik von M. NYMAN, K. GYDELL und B. NOSSLIN (Malmö, Sweden)	82
Eine quantitative Bestimmung des tryptophanreichen Serumpraealbumin im Agar-Agar von F. W. ALY und H. SCHAUPP (Marburg, Deutschland)	88
Isolation and description of a few properties of the β_{2A} -globulin of human serum by J. F. HEREMANS, M.-Th. HEREMANS and H. E. SCHULTZE (Louvain, Belgium and Marburg, Germany)	96
Development of foetal proteins by J. BODMAN (Pasadena, Calif., U.S.A.)	103
Étude du passage de la γ -globuline marquée à travers le placenta humain par R. MARTIN DU PAN, P. WENGER, S. KOECHLI, J. J. SCHEIDEGGER et J. ROUX (Genève, Suisse)	110
Immunoelektrophoretische Untersuchungen am menschlichen Spermaplasma von G. HERMANN (Homburg/Saar, Deutschland)	116
Electrophoretic protein and polysaccharide patterns in tuberculosis and amyloidosis by T. ARONSSON, A. GRÖNWALL and E. LAUSING (Uppsala, Sweden)	124
Spurennachweis von Albumin durch Analyse von Antigen-Antikörperpräzipitaten von F. LOHSS und E. KALLER (Tübingen, Deutschland)	127
Utilization of protein in the small intestine by F. HARTMANN (Marburg, Deutschland)	134
Darstellung und Identifizierung elektrophoretisch trennbarer Organproteine auf Agar-Gel von M. KESSEL (Berlin)	142

CLINICA CHIMICA ACTA

MANUSCRIPTS should be sent to one of the following Editors or to the Editorial Secretary,
Dr. TH. STRENGERS, Vredelaan 5, Laren N.H. (The Netherlands).

Dr. J. AWAPARA, Rice Institute, Houston 1, Tex. (U.S.A.)

Prof. P. BOULANGER, Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine, Cité Hospitalière,
Lille (France)

Prof. Dr. K. HINSBERG, Physiologisches und Biochemisches Institut der Medizinischen Akademie,
Moorenstrasse 5, Düsseldorf (Deutschland)

Dr. B. JOSEPHSON, Centrallaboratoriet, St. Eriks Sjukhus, Stockholm 18 (Sweden)

Prof. N. F. MACLAGAN, Department of Chemical Pathology, Westminster Medical School, Uni-
versity of London, Horseferry Road, London, S.W. 1 (England)

Prof. Dr. L. MASSART, Laboratorium voor Biochemie, Casinoplein 11, Ghent (Belgium)

Prof. Dr. V. N. OREKHOVITCH, Institut de Chimie Biologique et Médicale, Académie des Sciences
Médicales, Pogodinka 10, Moscow (U.S.S.R.)

Prof. Dr. F. RAPPAPORT, 6 Bialik Street, Tel Aviv (Israel)

Dr. M. SAITO, Department of Clinical Chemistry, The Annex Hospital of Tokyo University,
120 Zoshigaya, Bunkyo-ku, Tokyo (Japan)

Dr. M. C. SANZ, Hôpital Cantonal, Laboratoire Central, Genève (Suisse)

Prof. Dr. HJ. STAUDINGER, Zentrallaboratorium der Städtischen Krankenanstalten, Mannheim
(Deutschland)

Dr. C. P. STEWART, Clinical Laboratory, Royal Infirmary, Edinburgh (Scotland)

Dr. D. D. VAN SLYKE, Brookhaven National Laboratory, Upton, Long Island, N.Y. (U.S.A.)

Dr. J. C. M. VERSCHURE, Emmalaan 41, Utrecht (The Netherlands)

SUBSCRIPTIONS should be sent to:

ELSEVIER PUBLISHING COMPANY
110-112 Spuistraat, Amsterdam-C. (The Netherlands)

Subscription price: \$ 12.50 or £ 4.10.- or Dfl. 47.50 per Volume (postage free),
comprising 6 bimonthly issues of approx. 100 pages.

For advertisement rates apply to the publishers.

All rights reserved

ELSEVIER PUBLISHING CO., AMSTERDAM
Printed in The Netherlands by
N.V. DRUKKERIJ G. J. THIEME, NIJMEGEN